



ΓΕΩΠΟΝΙΚ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Χαρακτηρισμός ριζοβίων βακτηρίων που δομούν φυμάτια και αλληλεπιδρούν με το φυτό *Robinia pseudoacacia* υπό συνθήκες αλατότητας



Εμμανουήλ Α. Ζοάνος

Επιβλέπων καθηγητής:

Εμμανουήλ Φλεμετάκης, Καθηγητής ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ
2024

**ΓΕΩΠΟΝΙΚ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Χαρακτηρισμός ριζοβίων βακτηρίων που δομούν φυμάτια και αλληλεπιδρούν με το φυτό *Robinia pseudoacacia* υπό συνθήκες αλατότητας

Characterisation of rhizobial bacteria nodulating and interacting with black locust (*Robinia pseudoacacia*) plants in saline conditions

Εμμανουήλ Α. Ζοάνος

Εξεταστική Επιτροπή:

Εμμανουήλ Φλεμετάκης, Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Δημήτριος Βλαχάκης, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

Γεράσιμος Δάρας, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

Χαρακτηρισμός ριζοβίων βακτηρίων που δομούν φυμάτια και αλληλεπιδρούν με το φυτό *Robinia pseudoacacia* υπό συνθήκες αλατότητας

ΠΜΣ Βιολογία Συστημάτων
Τμήμα Βιοτεχνολογίας
Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας

Περίληψη

Η αύξηση της αλατότητας του εδάφους παγκοσμίως γίνεται ένα σημαντικό ζήτημα όσον αφορά την ανάπτυξη των φυτών και την καλλιέργεια των φυτών, ιδιαίτερα υπό το πρίσμα της κλιματικής αλλαγής. Μέχρι στιγμής έχουν προταθεί πολλές πιθανές λύσεις φιλικές προς το περιβάλλον για την άμβλυνση αυτού του προβλήματος. Η χρήση στελεχών ριζοβίων ικανών να εγκαθιδρύουν μια ιδιαίτερα αποτελεσματική συμβιωτική σχέση με πολύτιμα ψυχανθή και να ανέχονται ορισμένα επίπεδα αλατότητας αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση για την αντιμετώπιση του ζητήματος αυτού. Στην παρούσα μελέτη, σαράντα οκτώ στελέχη ριζοβίων που απομονώθηκαν, από το ψυχανθές δέντρο *Robinia pseudoacacia*, χαρακτηρίστηκαν φαινοτυπικά και δοκιμάστηκαν *in vitro* ως προς την ανοχή τους στην αλατότητα. Με βάση την ανοχή τους σε συνθήκες αλατότητας, επιλέχθηκαν έξι στελέχη και προσδιορίστηκαν γονοτυπικά με αλληλουχία του γονιδίου 16S rRNA, τριών χρωμοσωμικών γονιδίων (*atpD*, *glnII* και *recA*) και δύο πλασμιδιακών γονιδίων (*nifH* και *nodA*). Η φυλογένεση με βάση την MLSA επέτρεψε την ταξινομική ταυτοποίηση των επιλεγμένων στελεχών ριζοβίων βακτηρίων και τα κατέταξε στο *Mesorhizobium* *sp.* Επιπλέον, η ικανότητά τους να σχηματίζουν αποτελεσματικά φυμάτια στις ρίζες των φυτών αξιολογήθηκε με τη δοκιμή σχηματισμού φυματίων. Τα σπορόφυτα *R. pseudoacacia* που εμβολιάστηκαν είτε με στελέχη ευαίσθητα στο αλάτι είτε με στελέχη ανεκτικά στο αλάτι αναπτύχθηκαν σε περιβάλλον ελέγχου, συλλέχθηκαν όταν οι φαινοτυπικές αλλαγές ήταν εμφανείς και αξιολογήθηκαν για διάφορα φαινοτυπικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά, συμπεριλαμβανομένης της δραστηριότητας της νιτρογενάσης. Με βάση τη συνδυαστική ανάλυση, επιλέχθηκαν τα τρία πιο αποτελεσματικά στελέχη και αναλύθηκαν περαιτέρω με τη χρήση τεχνικών αλληλουχίσης νέας γενιάς (NGS). Δύο από αυτές τις απομονώσεις επιλέχθηκαν λόγω της ικανότητάς τους να ανέχονται εξαιρετικά αλατούχα εδάφη (έως 5%), ενώ η τρίτη απομόνωση επιλέχθηκε λόγω της ευαισθησίας της στο στρες αλατότητας. Στόχος μας ήταν να συγκρίνουμε τα γονιδιώματά τους και να εντοπίσουμε συγκεκριμένα γονίδια ενδιαφέροντος, προκειμένου να εμβαθύνουμε στην κατανόηση των πιθανών εφαρμογών τους ως ωφέλιμων εμβολίων σε συνθήκες αλατούχου εδάφους.

Επιστημονική Περιοχή: Περιβαλλοντική Βιοτεχνολογία

Λέξεις Κλειδιά: *Robinia pseudoacacia*; ριζόβια βακτήρια; αλατότητα εδάφους; ανεκτικότητα στην αλατότητα; γονιδιωματική ανάλυση

Characterisation of rhizobial bacteria nodulating and interacting with black locust (*Robinia pseudoacacia*) plants in saline conditions

MSc. in Systems Biology
Department of Biotechnology
Laboratory of Molecular Biology

Abstract

The increase of soil salinity worldwide is becoming an important issue regarding plant growth and crop cultivation. Many possible environmentally friendly solutions have been proposed thus far to alleviate this concern. The use of rhizobia strains capable of establishing a highly efficient symbiotic relationship with valuable legume plants and tolerating certain salinity levels is a promising approach to tackle this issue. In the present study, forty-eight rhizobia strains isolated, from the leguminous tree *Robinia pseudoacacia* were phenotypically characterized and tested *in vitro* for their tolerance to salinity. Based on their tolerance to salinity conditions, six strains were selected and genotyped by sequencing 16S rRNA gene, three chromosomal genes (*atpD*, *glnII* and *recA*) and two plasmid genes (*nifH* and *nodA*). MLSA-based phylogeny allowed the taxonomic identification of selected rhizobia strains and assigned them to *Mesohorizobium* sp. Furthermore, their ability to form effective nodules on plant roots was assessed by nodulation test. *R. pseudoacacia* seedlings inoculated with either salt-sensitive or salt-tolerant strains were grown in control environment, collected when the phenotypic changes were evident and evaluated for several phenotypic and biochemical traits, including nitrogenase activity. Based on the combined analysis, three most efficient strains were selected and further analyzed using NGS techniques. Two of these isolates were chosen for their ability to tolerate extremely saline soils (up to 5%) while the third isolate was selected due to its sensitivity to salt stress. We aimed to compare their genomes and pinpoint specific genes of interest in order to deepen our understanding of their potential applications as beneficial inoculum in saline soil conditions.

Scientific area: Environmental Biotechnology

Keywords: *Robinia pseudoacacia*; rhizobia bacteria; soil salinity; salinity tolerance; genomic analysis

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη	3
Abstract	4
Ευχαριστίες	8
1. Εισαγωγή.....	9
1.1 Συμβιωτική Αζωτοδέσμευση	9
1.1.1 Η Αζωτοδέσμευση	9
1.1.2 Η Νιτρογενάση στην αζωτοδέσμευση	9
1.1.2 Γενετική και ρύθμιση της νιτρογενάσης.....	10
1.1.3 Τα ριζόβια και η συμβίωση τους με τα ψυχανθή.....	11
1.1.4 Στάδια σχηματισμού των ριζικών φυματίων	13
1.1.5 Γονίδια nod, πρωτεΐνες Nod και παράγοντες nod.....	13
1.1.6 Ανταλλαγή σημάτων κατά την εγκαθίδρυση της συμβίωσης.....	15
1.1.7 Βακτηριοειδή και έναρξη αζωτοδέσμευσης	15
1.1.8 Γονίδια Αναφοράς στα ριζόβια αντίδραση	16
1.1.8.1 Γλουταμινική Συνθετάση.....	16
1.1.8.2 ATP συνθετάση.....	17
1.1.8.3 Ρεκομπινάση A	17
1.2 Φυλογένεια συμβιωτικών ριζοβίων	17
1.2.1 Τα κυριότερα γένη ριζοβίων στα ψυχανθή.....	17
1.2.2 Τα κυριότερα γένη ριζοβίων στο φυτό <i>Robinia pseudoacacia</i>	19
1.3 ΤΟ ΦΥΤΟ <i>Robinia pseudoacacia</i>	19
1.3.1 Ταξινόμηση και ιστορικά δεδομένα.....	19
1.3.2 Περιγραφή χαρακτηριστικών.....	20
1.3.3 Συνθήκες ανάπτυξης.....	21
1.3.3.1 Κλιματικές απαιτήσεις.....	22
1.3.3.2 Εδαφικές απαιτήσεις.....	22
1.3.4 Αναπαραγωγή	22
1.3.4.1 Άνθιση και καρπόδεση.....	22
1.3.4.2 Επικονίαση.....	22

1.3.4.3 Παραγωγή σπερμάτων	23
1.3.4.4 Πολλαπλασιασμός.....	23
1.3.5 Εφαρμογές και χρήσεις	23
1.4 Αλατότητα.....	24
1.4.1 Το πρόβλημα της αλατότητας του εδάφους.....	24
1.4.2 Αλατότητα και φυτά	25
1.4.3 Αλατότητα και ριζόβια βακτήρια.....	27
1.4.4 Επίδραση καταπόνησης αλατότητας στα ψυχανθή φυτά.....	29
2. Υλικά και Μέθοδοι	31
2.1 Θρεπτικά Μέσα.....	31
2.2 Δοκιμή ανεκτικότητας στην αλατότητα.....	33
2.3 Ενίσχυση γονιδιακών τμημάτων με χρήση Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης – Polymerase Chain Reaction, PCR	34
2.4 Ηλεκτροφόρηση.....	35
2.5 Φυλογενετικά δέντρα.....	36
2.6 Μόλυνση σπόρων DB και SD με τα ριζόβια βακτήρια.....	37
2.6.1 Το φυτό	37
2.6.2 Επιφανειακή αποστείρωση και τραυματισμός σπόρων	37
2.6.3 Ανάπτυξη και μόλυνση των νεαρών φυταρίων:	38
2.6.3.1 Θρεπτικά υλικά για την πρόβλαστηση και την ανάπτυξη των φυταρίων.	39
2.7 Βιομετρία και μέτρηση δραστηριότητας νιτρογενάσης.....	40
2.7.1 Βιομετρία	40
2.7.2 Δραστηριότητα Νιτρογενάσης.....	40
2.8 Συγκριτική γονιδιωματική	41
2.8.1 Αλληλούχιση νεας γενεάς (Next Generation Sequencing, NGS)	41
2.8.2 Αλληλούχιση κατά ζεύγη (paired-end)	42
2.8.3 Εργαλείο PATRIC / BV-BRC	43
2.8.4 Εργαλείο Orthovenn 3	44
3. Αποτελέσματα.....	46
3.1 Ανάπτυξη στελεχών ριζοβίων σε συνθήκες υψηλής αλατότητας	46
3.1.1 Ανάπτυξη σε στερεά υποστρώματα	46
3.1.2 Κινητική βακτηριακής ανάπτυξης σε συνθήκες υψηλής αλατότητας	51

3.2 Φυλλογενετική ανάλυση στελεχών.....	58
3.2.1 Ενίσχυση με PCR συμβιωτικών γονιδίων 16s για τα YP βακτηριακά στελέχη	58
3.2.2 Ενίσχυση με PCR συμβιωτικών γονιδίων <i>nifH</i> και <i>nodA</i> για τα YP βακτηριακά στελέχη.....	58
3.2.3 Ενίσχυση με PCR γονιδίων <i>recA</i> , <i>glnII</i> και <i>atpD</i> για τα YP βακτηριακά στελέχη.....	60
3.3 Φυλογενετικά δένδρα.....	61
3.4 Βλαστηση σπορων και αναπτυξη φυταριων.....	67
3.4.1 Βλάστηση σπόρων	67
3.4.2 Ανάπτυξη των νεαρών φυτών και εφαρμογή βακτηριακών στελεχών σε αυτά.....	67
3.5 Βιομετρία	69
3.6 Δραστικότητα Νιτρογενάσης.....	82
3.7 Συγκριτική Γονιδιωματική/Γονιδιωματική Ανάλυση.....	83
3.7.1 Ανασύσταση Γονιδιώματος	83
3.7.2 Στέλεχος YP 222.....	84
3.7.3 Στέλεχος YP 364.....	89
3.7.4 Στέλεχος YP 412.....	95
3.7.5 Γονίδια που σχετίζονται με την ανεκτικότητα στην αλατότητα	102
3.7.6 Σύγκριση γωνιδιομάτων με χρήση του εργαλείου OrthoVenn 3	110
3.7.7 Αξιοσημείωτες πρωτεΐνες που προβλέφθηκαν	111
4. Συζήτηση.....	114
5. Βιβλιογραφία.....	117
Ελληνική Βιβλιογραφία	117
Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία.....	117
Βιβλιογραφία εικόνων	122
Βιβλιογραφία <i>patric</i>	122
Orthovenn 3	123
6. Επίμετρο.....	124

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή Φλεμετάκη Εμμανουήλ στο πλαίσιο του προπτυχιακού προγράμματος σπουδών της Βιοτεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή Εμμανουήλ Φλεμετάκη που με δέχθηκε στην εργαστηριακή του ομάδα στα πλαίσια της εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας καθώς και για την καθοδήγηση και την κατανόηση του. Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Μεταδιδακτορικό ερευνητή του εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας Δημήτρη Σκληρό ο οποίος ήταν πάντοτε πρόθυμος να με καθοδηγήσει και να με συμβουλευτεί τόσο σε θέματα του πειράματος όσο και στην συγγραφή της συγκεκριμένης εργασίας καθώς και τη Μεταδιδακτορική ερευνήτρια στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας Αικατερίνη Καλιαμπάκου για τις γνώσεις της που μου μετέφερε και τη σημαντική της συμβολή στη διεξαγωγή μέρους της πειραματικής πορείας.

Επίσης οφείλω ένα ευχαριστώ στις Διδακτορικές και Μεταπτυχιακές φοιτήτριες του εργαστηρίου οι οποίες μου μετέδωσαν τεχνογνωσία και δημιουργούν ένα πολύ ευχάριστο κλίμα εργασίας – συνεργασίας. Ακόμα, θέλω να ευχαριστήσω τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, τους Επίκουρο Καθηγητή Γεράσιμο Δάρα και Αναπληρωτή Καθηγητή Δημήτριο Βλαχάκη, για την συμμετοχή τους στην αξιολόγηση της εργασίας μου και για τον χρόνο που αφιέρωσαν.

Τέλος οφείλω ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στην Scientific Researcher II Rodica Catalina Efrose, του Department of Experimental and Applied Biology NIRDBS-Institute of Biological Research Iasi , η οποία ως επισκέπτρια ερευνήτρια στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας ήταν πάντα δίπλα μου στην εκπόνηση της μεταπτυχιακής εργασίας για υποδείξεις, συμβουλές και καθοδήγηση, μου μετέφερε το πως πρέπει να λειτουργεί κάποιος εντός εργαστηρίου, με έμαθε πληθώρα τεχνικών και δομημένη επιστημονική σκέψη και τέλος ήταν ο καταλυτικός παράγοντας της επιτυχούς διεξαγωγής της μεταπτυχιακής μου μελέτης.

1. Εισαγωγή

1.1 Συμβιωτική Αζωτοδέσμευση

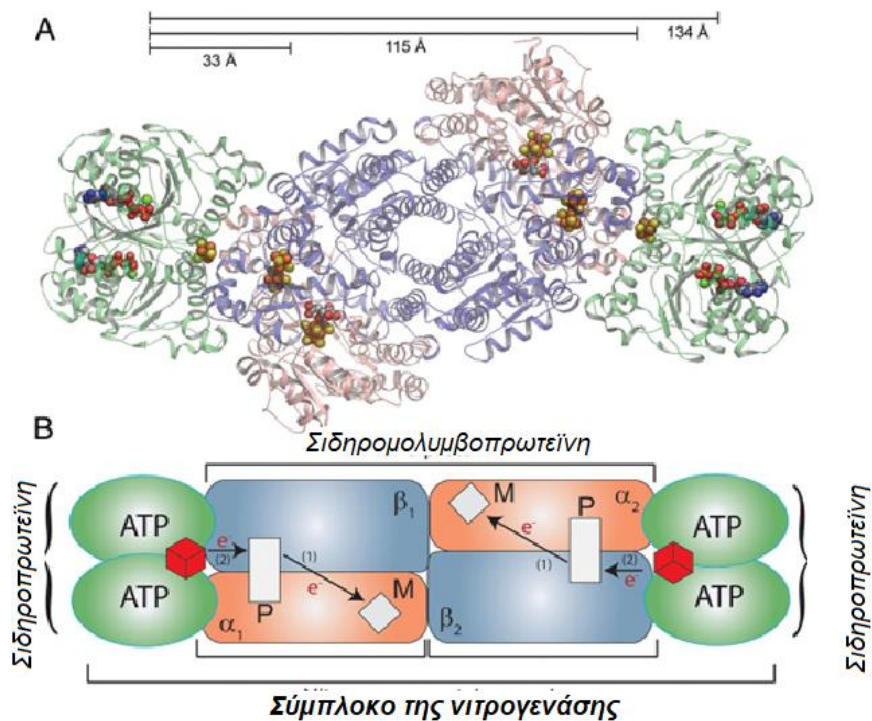
1.1.1 Η Αζωτοδέσμευση

Το άζωτο είναι το τέταρτο συχνότερο στοιχείο στην μάζα των έμβιων όντων, και το μεγαλύτερο μέρος του αζώτου περιέχεται σε αμινοξέα και νουκλεοτίδια στους οργανισμούς. Η σημαντικότερη πηγή αζώτου είναι ο ατμοσφαιρικός αέρας ο οποίος και αποτελείται κατά 78% από μοριακό άζωτο N_2 , το οποίο από τους περισσότερους οργανισμούς δεν είναι άμεσα εκμεταλλεύσιμο. Εξάιρεση αποτελούν οργανισμοί οι οποίοι δύνανται να αζωτοδεσμεύουν. Αζωτοδέσμευση ή καθήλωση αζώτου (nitrogen fixation) ονομάζεται η διαδικασία κατά την οποία το αέριο άζωτο χρησιμοποιείται ως πηγή κυτταρικού αζώτου. Οργανισμοί οι οποίοι δύνανται να πραγματοποιήσουν αζωτοδέσμευση δεν χρειάζεται να προσλάβουν και να μεταβολίσουν αζωτούχες ενώσεις για την παροχή τους με άζωτο, το οποίο είναι απαραίτητο για την διαβίωσή τους. Η ικανότητα αυτή απαντάται μονάχα σε ορισμένους προκαρυωτικούς μικροοργανισμούς (αερόβιους αλλά και αναερόβιους), οι οποίοι και έχουν σημαντικό οικολογικό πλεονέκτημα έναντι άλλων μικροοργανισμών που δεν αζωτοδεσμεύουν. Κάποια από τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια δομούν συμβιωτικές σχέσεις με φυτά, δεσμεύουν άζωτο δηλαδή όταν συμβιούν με κάποιο φυτό. Κατά την αζωτοδέσμευση, το N_2 ανάγεται σε αμμώνιο και το αμμώνιο μετατρέπεται σε κάποια οργανική μορφή του. Η αντίδραση της αναγωγής καταλύεται από το ένζυμο νιτρογενάση.

1.1.2 Η Νιτρογενάση στην αζωτοδέσμευση

Η νιτρογενάση είναι ένα σύμπλεγμα (complex) δύο θειούχων σιδηροπρωτεϊνών οι οποίες όμως δεν έχουν την αίμη ως προσθετική ομάδα, όπως οι περισσότερες σιδηροπρωτεΐνες που συναντώνται στα έμβια όντα. Η πρώτη από αυτές τις σιδηροπρωτεΐνες ονομάζεται δινιτρογενάση (dinitrogenase) έχει μοριακό βάρος 222.000 και περιέχει σίδηρο, θείο και μολυβδαίνιο σε αναλογία που κυμαίνεται από 24:24:2 έως 36:36:2 ανά μόριο. Η δεύτερη σιδηροπρωτεΐνη της νιτρογενάσης ονομάζεται αναγωγάση της δινιτρογενάσης (dinitrogenase reductase ή NifH) δεν περιέχει μολυβδαίνιο αλλά σίδηρο και θείο σε αναλογία 4:4 (4Fe : 4S ανά μόριο) και έχει μοριακό βάρος 60.000. Το ενεργειακό έναυσμα για την αντίδραση δίνεται από την αναπνευστική αποδόμηση των υδατανθράκων, η οποία έχει σαν συνέπεια την απελευθέρωση ενέργειας σε μορφή ATP και ηλεκτρονίων. Τα παραγόμενα ηλεκτρόνια παραλαμβάνονται από έναν φορέα (φερρεδοξίνη ή FAD) ο οποίος τα διαβιβάζει στην αναγωγάση της δινιτρογενάσης. Η τελευταία με τη σειρά της διαβιβάζει τα ηλεκτρόνια στην δινιτρογενάση, η οποία είναι ο τελικός δότης των ηλεκτρονίων στο N_2 . Κατά την διαδικασία όμως της μεταφοράς των ηλεκτρονίων από την αναγωγάση στην δινιτρογενάση και από αυτή στο N_2 , είναι απαραίτητη η κατανάλωση ATP σε αναλογία 15-30 ATP ανά μόριο αναγόμενου N_2 (Shanmugam et al., 1978).

Η δέσμευση του αζώτου είναι ισχυρά αναγωγική διεργασία στη φύση, που όμως αναστέλλεται από την παρουσία οξυγόνου, το οποίο ταχύτατα και μη αντιστρεπτά αναστέλλει τη δράση δινιτρογενάσης (ακόμη και όταν το ένζυμο έχει απομονωθεί από αερόβια αζωτοδεσμευτικά βακτήρια).



Εικόνα 1.1 Το σύμπλεγμα της νιτρογενάσης (A) Διάγραμμα κορδέλας του συμμετρικού τριμερούς συμπλόκου [MoFe(Fe red (ATP)₂)₂] (κωδικός PDB ID 1G21) με τις υπομονάδες της πρωτεΐνης MoFe σε σομόν (α υπομονάδες) και μπλε (β υπομονάδες) στο κέντρο με δύο πρωτεΐνες Fe (πράσινες) συνδεδεμένες σε κάθε άκρο. Σημειώνονται οι αποστάσεις μεταξύ των θέσεων πρόσδεσης ATP στη μία πρωτεΐνη Fe και του συμπλέγματος P, της διεπιφάνειας στην απέναντι πλευρά και των θέσεων πρόσδεσης ATP στην άλλη πρωτεΐνη Fe. (B) Παρουσιάζεται ένα σχήμα της νιτρογενάσης με τη συστάδα [4Fe-4S] της πρωτεΐνης Fe ως κόκκινους κύβους και στις δύο πρωτεΐνες Fe, τις συστάδες P ως λευκά ορθογώνια και τη FeMo-co ως λευκά διαμάντια. Η διαδρομή της κίνησης των ηλεκτρονίων συμβολίζεται με βέλη και οι αριθμοί (1) και (2) και υποδεικνύουν τη σειρά της ET.)

1.1.2 Γενετική και ρύθμιση της νιτρογενάσης

Το N₂ είναι ένα εξαιρετικά αδρανές μόριο εξαιτίας του τριπλού δεσμού N ≡ N, για αυτό το λόγο απαιτούνται υψηλά ποσά ενέργειας ούτως ώστε να ενεργοποιηθεί. Εξαιτίας αυτής της ανάγκης η σύνθεση και η ενεργότητα της νιτρογενάσης υφίστανται λεπτομερή ρύθμιση. Για την κωδίκευση των ρυθμιστικών πρωτεϊνών και των ενζύμων που συμμετέχουν στην καθήλωση του N₂ απαιτούνται πολλά γονίδια. Έχει δειχθεί πως τα γονίδια της δινιτρογενάσης και της αναγωγάσης της δινιτρογενάσης στον οργανισμό *Klebsiella pneumoniae* ανήκουν σε ένα μεγάλο δίκτυο οπερονίων, σε ένα σύνθετο ρυθμιζόνιο, το ρυθμιζόνιο nif (nif regulon). Το ρυθμιζόνιο nif του *K. pneumoniae* εκτείνεται σε μήκος 24 kb DNA και περιέχει 20 γονίδια οργανωμένα σε έναν αριθμό μεταγραφικών μονάδων. Εκτός από τα δομικά γονίδια της νιτρογενάσης, το ρυθμιζόνιο αυτό περιλαμβάνει επίσης τα 8 γονίδια του FeMo-co, γονίδια που ελέγχουν τις πρωτεΐνες μεταφοράς ηλεκτρονίων, καθώς και ορισμένα ρυθμιστικά γονίδια. Η δινιτρογενάση είναι μια ετεροτετραμερής πρωτεΐνη που συγκροτείται από δύο υπομονάδες, την α (προϊόν του γονιδίου nifD) και τη β (προϊόν του γονιδίου nifK), που η καθεμία υπάρχει δύο φορές. Η αναγωγή της δινιτρογενάσης είναι ένα ομοδιμερές, αποτελούμενο από δύο πανομοιότυπες υπομονάδες (συνιστούν προϊόν του γονιδίου nifH).

Στη σύνθεση FeMo-co συμμετέχουν πολλά γονίδια, μεταξύ των οποίων τα *nifN*, *nifV*, *nifZ*, *nifW*, *nifE*, *nifB* καθώς και το *nifQ* που κωδικεύει ένα πολυπεπτίδιο που έχει σχέση με την επεξεργασία του μολυβδαινίου. Τέλος, το γονίδιο *nifA* κωδικεύει μια ρυθμιστική πρωτεΐνη που ενεργοποιεί τη μεταγραφή άλλων γονιδίων *nif*. Η νιτρογενάση είναι μια πολύ καλά συντηρημένη πρωτεΐνη και τα δομικά γονίδια *nifH*, *nifD*, *nifK* έχουν χρησιμοποιηθεί ως μοριακοί ανιχνευτές για να εντοπιστεί η ύπαρξη ομόλογων γονιδίων στο DNA διαφόρων προκαρυωτικών οργανισμών. Η νιτρογενάση υπόκειται σε αυστηρούς ρυθμιστικούς ελέγχους. Η δέσμευση αζώτου αναστέλλεται από το O₂ και από ενώσεις του αζώτου, όπως NH₃, NO₃ - και ορισμένα αμινοξέα. Το κύριο μέρος της ρύθμισης γίνεται στο μεταγραφικό επίπεδο. Η μεταγραφή των δομικών γονιδίων *nif* ενεργοποιείται από την πρωτεΐνη NifA (θετική ρύθμιση), ενώ η πρωτεΐνη NifL είναι αρνητικός ρυθμιστής της έκφρασης των γονιδίων *nif* και περιέχει ένα μόριο FAD (οξειδοαναγωγικό συνένζυμο των φλαβοπρωτεϊνών) το οποίο καθορίζει την ικανότητα της πρωτεΐνης να αντιλαμβάνεται την παρουσία O₂. Όταν υπάρχει επάρκεια O₂, η μεταγραφή των γονιδίων *nif* καταστέλλεται από την πρωτεΐνη NifL, ώστε να αποφευχθεί η σύνθεση της ευαίσθητης στο οξυγόνο νιτρογενάσης. Η αμμωνία καταστέλλει την δέσμευση N₂ μέσω μιας άλλης πρωτεΐνης, της NtrC, η δράση της οποίας ρυθμίζεται από τα επίπεδα αζώτου στο κύτταρο. Όταν η συγκέντρωση αμμωνίας είναι οριακή, η πρωτεΐνη NtrC ενεργοποιείται και επάγει τη μεταγραφή του γονιδίου *nifA*. Αποτέλεσμα είναι η σύνθεση της NifA πρωτεΐνης που δρα ως ενεργοποιητής της αζωτοδέσμευσης και η μεταγραφή των υπολοίπων γονιδίων *nif*. (Madigan M.,2005). Τα ψυχανθή και τα ακτινορριζικά φυτά (διάφορα είδη ξυλωδών φυτικών ειδών, όπως τα δένδρα του γένους *Alnus* – σκλήθρο) ρυθμίζουν τη διαπερατότητα των αερίων στα φυμάτιά τους, διατηρώντας μέσα σε αυτά ένα επίπεδο οξυγόνου που μπορεί να υποστηρίξει την αναπνοή, αλλά είναι αρκετά χαμηλό, ώστε να αποφεύγεται η αδρανοποίηση της νιτρογενάσης (Kuzma et al. 1993)

1.1.3 Τα ριζόβια και η συμβίωση τους με τα ψυχανθή

Ο όρος "ριζόβια" είναι ένας συλλογικός όρος που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των α- και β-πρωτεοβακτηρίων ικανά να εγκαθιδρύουν ενδοσυμβιωτικές αμοιβαίες αλληλεπιδράσεις με ψυχανθή και να δεσμεύουν το ατμοσφαιρικό άζωτο (Efroze et.al. 2012).

Η συμβιωτική αζωτοδέσμευση είναι μια πολύ σημαντική διαδικασία-αλληλεπίδραση φυτών και βακτηρίων που παρουσιάζει και μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον. Η σχέση αλληλεπίδρασης αναπτύσσεται μεταξύ ψυχανθών φυτών και ορισμένων αρνητικών κατά Gram αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων. Τα ψυχανθή ανήκουν στην οικογένεια των Κυαμοειδών (*Fabaceae*) και στην τάξη των Κυαμωδών (*Fabales*) συνιστούν μια πολυμελή ομάδα φυτών. Είναι φυτά δικοτυλήδωνα, ετήσια, διετή ή πολυετή, τα φύλλα τους είναι συνήθως σύνθετα, τα σπέρματά τους ωριμάζουν μέσα σε λοβούς και τα άνθη τους μοιάζουν με «ψυχή» δηλαδή με πεταλούδα. Στα ψυχανθή ανήκουν φυτά με μεγάλη οικονομική σημασία, όπως η σόγια, το τριφύλλι, τα λούπινα, τα φασόλια, ο αρακάς κλπ. Τα γένη *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Ensifer* (πρώην *Sinorhizobium*), *Mesorhizobium* και *Azorhizobium* είναι αρνητικά κατά Gram ραβδόμορφα βακτήρια με ικανότητα αυτοτελούς κίνησης. Εάν βακτήρια από αυτά τα γένη περιέχουν κατάλληλα γονίδια για αλληλεπίδραση με τα φυτά αυτά, όπως θα δούμε στην συνέχεια, τότε δύναται να μολύνουν την ρίζα του ψυχανθούς και να σχηματιστούν ριζικά φυμάτια (root nodules), τα οποία μπορούν να ενσωματώνουν αέριο άζωτο σε ενώσεις του αζώτου με την διαδικασία της αζωτοδέσμευσης. Αν πρόκειται για στέλεχος αποτελεσματικό, τότε τα φυμάτια είναι μεγάλα, κοκκινωπά και μπορούν να δεσμεύουν άζωτο. Η σηματοδότηση μεταξύ των δύο συμβιωτών, η επακόλουθη διεργασία προσβολής και η ανάπτυξη

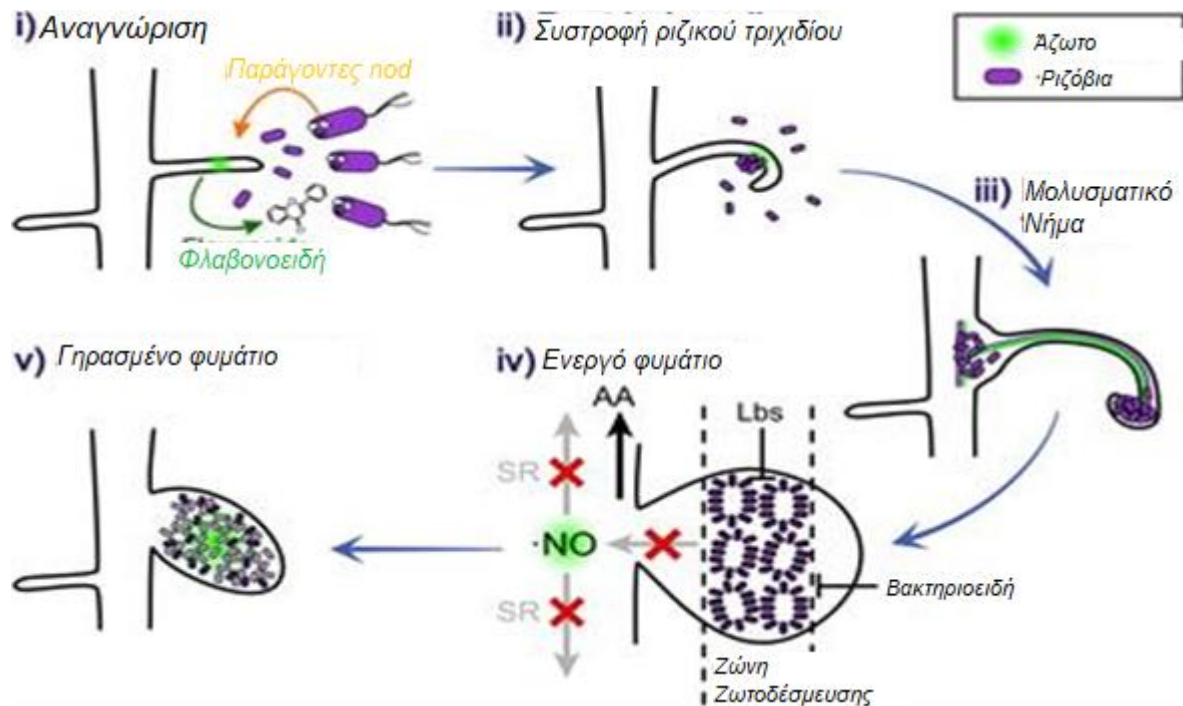
αζωτοδεσμευτικών φυματίων καθορίζεται από την ύπαρξη συγκεκριμένων γονιδίων, τόσο του ξενιστή-ψυχανθούς, όσο και του βακτηρίου (γονίδια nod) (Oldroyd & Downie 2008). Το Azorhizobium μπορεί να σχηματίσει φυμάτια όχι μόνο στις ρίζες, αλλά και στους βλαστούς του φυτού. Επειδή πολλά εδάφη είναι εκ φύσεως φτωχά σε άζωτο, τα ψυχανθή με ριζικά φυμάτια έχουν στις συνθήκες αυτές συγκριτικό πλεονέκτημα και μπορούν να αναπτυχθούν καλά σε περιοχές όπου άλλα φυτά αδυνατούν. Ειδικότερα, τα βακτήρια του γένους *Rhizobium*, της οικογένειας *Rhizobiaceae*, είναι ραβδία διαστάσεων $0,5-0,9 \times 1,2-3\mu$. Ανήκουν στο φύλο *Proteobacteria* και στην τάξη α -*Proteobacteria*, μαζί με τα *Bradyrhizobium*. Μπορούν να αζωτοδεσμεύουν μόνο σε φυμάτια (nodules) ριζών ψυχανθών φυτών και μόνο όταν μετατραπουν σε βακτηριοειδή (bacteroids). Η δομή αυτή κατέχει το σύνολο των γονιδίων που σχετίζονται με την αζωτοδέσμευση. Τα γονίδια αυτά φυσιολογικά βρίσκονται σε αδράνεια-καταστολή, ενώ ενεργοποιούνται κάτω από ειδικές συνθήκες. Τα ριζόβια μετατρέπουν το άζωτο σε διαθέσιμη μορφή για τα φυτά και τα φυτά αντίστοιχα τους παρέχουν ουσίες απαραίτητες για τον μεταβολισμό και κατ' επέκταση την επιβίωσή τους. Η συμβιωτική σχέση βακτηρίων *Rhizobium* (και *Bradyrhizobium*) με ψυχανθή είναι μεγάλης οικονομικής σημασίας, καθώς αυξάνει σημαντικά τις ποσότητες διαθέσιμου αζώτου στο έδαφος και έχει μελετηθεί σε βάθος με στόχο τη δημιουργία παρόμοιων συμβιωτικών σχέσεων των βακτηρίων αυτών και με άλλα φυτά (Αγγελής, 2007). Απομονωμένα ούτε τα ψυχανθή ούτε τα *Rhizobium* μπορούν να δεσμεύσουν ατμοσφαιρικό άζωτο, είναι απαραίτητο να αλληλοεπιδράσουν οι οργανισμοί αυτοί και να δομήσουν συμβιωτική σχέση ούτως ώστε να πραγματοποιηθεί αζωτοδέσμευση. Το *Rhizobium* χρειάζεται κάποια ποσότητα O_2 για να παράγει την απαιτούμενη ενέργεια για την δέσμευση του N_2 , αλλά η νιτρογενάση του, καθώς και γενικά οι νιτρογενάσες άλλων αζωτοδεσμευτικών οργανισμών, απενεργοποιείται από το O_2 , όπως προαναφέρθηκε. Στο φυμάτιο, ο ακριβής έλεγχος των επιπέδων οξυγόνου επιτελείται από την οξυγονοδεσμευτική αιμοσφαιρίνη των ψυχανθών – ψυχανθαιμοσφαιρίνη (leghemoglobin). Πρόκειται για μια ερυθρή σιδηροφόρο πρωτεΐνη που έχει αίμη ως προσθετική ομάδα και η οποία συναντάται πάντοτε στα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια. Κανένα φυτό ή *Rhizobium* δεν μπορεί να συνθέσει από μόνο του την αιμοσφαιρίνη των ψυχανθών και θεωρείται ότι ο σχηματισμός της επάγεται από την αλληλεπίδραση των δύο οργανισμών. Το φυτό-ξενιστής παράγει το τμήμα της σφαιρίνης της ψυχανθαιμοσφαιρίνης ως αντίδραση στην προσβολή από τα βακτήρια (Marscher 1995). Το συμβιωτικό βακτήριο παράγει το τμήμα της αίμης. Η αιμοσφαιρίνη των ψυχανθών λειτουργεί ως «ρυθμιστής οξυγόνου»: μετασχηματίζεται εναλλάξ από την οξειδωμένη (Fe^{3+}) μορφή της στην ανηγμένη (Fe^{2+}) μορφή, διατηρώντας έτσι το ελεύθερο O_2 στο εσωτερικό του φυματίου σε χαμηλό αλλά και σταθερό επίπεδο. Άλλες έρευνες υποδεικνύουν ότι η ψυχανθαιμοσφαιρίνη αποθηκεύει τόσο οξυγόνο όσο για να υποστηρίξει την αναπνοή των φυματίων για λίγα μόνο δευτερόλεπτα (Denison & Harter 1995). Τέλος, αναφέρεται ότι η λειτουργία της σχετίζεται με την πρόσληψη και τη μεταφορά οξυγόνου για την αναπνοή των συμβιωτικών κυττάρων, σε αναλογία με τον τρόπο με τον οποίο η αιμοσφαιρίνη μεταφέρει οξυγόνο στους ιστούς των ζώων (Ludwig & de Vries 1986). Η ικανότητα ανάπτυξης φυματίων προσδιορίζεται γύρω στο 90% των ψυχανθών. Ωστόσο, υπάρχει σαφής εξειδίκευση μεταξύ των ειδών των ψυχανθών και των στελεχών βακτηρίων του γένους *Rhizobium*. Κατά κανόνα, ένα είδος *Rhizobium* είναι ικανό να μολύνει ορισμένα μόνο 10 είδη ψυχανθών και όχι άλλα. Η ομάδα στελεχών του *Rhizobium* που μπορούν να μολύνουν μια ομάδα συγγενικών ψυχανθών ονομάζεται ομάδα διασταυρούμενου εμβολιασμού. Ωστόσο, ακόμη κι αν ένα στέλεχος *Rhizobium* μολύνει ένα συγκεκριμένο ψυχανθές, δεν είναι πάντοτε δεδομένη η παραγωγή αζωτοδεσμευτικών φυματίων. Αν πρόκειται για στέλεχος αναποτελεσματικό, τα φυμάτια που σχηματίζονται είναι μικρά, έχουν λευκοπράσινη απόχρωση και δεν δεσμεύουν άζωτο.

1.1.4 Στάδια σχηματισμού των ριζικών φυματίων

Τα στάδια σχηματισμού των ριζικών φυματίων ψυχανθούς που έχει μολυνθεί με *Rhizobium* απεικονίζονται στην Εικόνα 1.1 και επιγραμματικά είναι τα εξής:

- 1) Αμοιβαία αναγνώριση του σωστού εταίρου, από την πλευρά τόσο του φυτού όσο και του βακτηρίου και προσκόλληση του βακτηρίου στα ριζικά τριχίδια.
- 2) Έκκριση των παραγόντων *nod* από το βακτήριο.
- 3) Διείσδυση του νήματος μόλυνσης, του οποίου ο σχηματισμός επάγεται από το βακτήριο, στο εσωτερικό του ριζικού τριχιδίου.
- 4) Μετατόπιση από το νήμα μόλυνσης προς το κυρίως σώμα της ρίζας.
- 5) Σχηματισμός βακτηριοειδών (παραμορφωμένων βακτηριακών κυττάρων) μέσα στα φυτικά κύτταρα και ανάπτυξη αζωτοδεσμευτικής ικανότητας.
- 6) Συνεχείς διαιρέσεις των βακτηριακών και φυτικών κυττάρων και σχηματισμός ώριμων ριζικών φυματίων.

(Brock, 2005. ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ. ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΕΣ ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΚΡΗΤΗΣ)

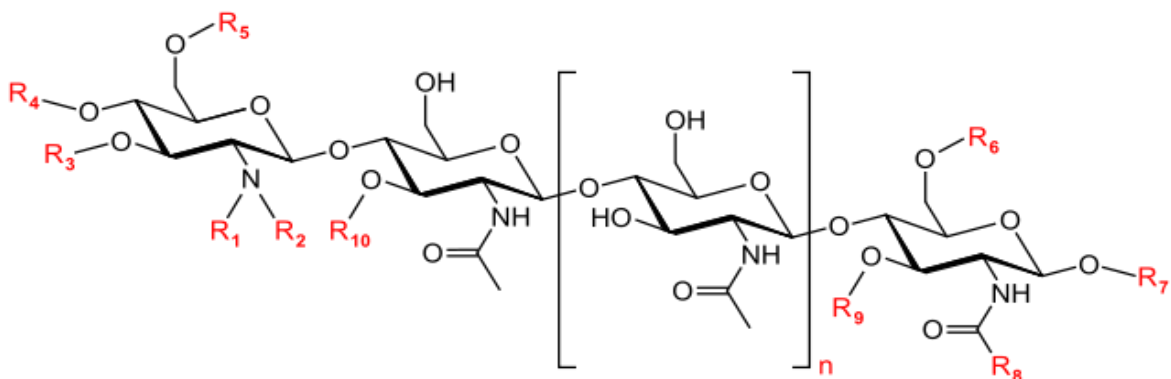


Εικόνα 1.2: Στάδια σχηματισμού των ριζικών φυματίων ψυχανθούς που έχει μολυνθεί με *Rhizobium*.

1.1.5 Γονίδια *nod*, πρωτεΐνες *Nod* και παράγοντες *nod*

Τα γονίδια *nod* έχουν καθοριστικό ρόλο στην αλληλουχία των διαδικασιών (τυπικά στα στάδια) του σχηματισμού φυματίων στο ζεύγος ψυχανθές–*Rhizobium*. Πολλά γονίδια *nod*, ακόμη και σε διαφορετικά είδη *Rhizobium*, φαίνεται ότι έχουν αξιοσημείωτη εξελικτική συντήρηση και βρίσκονται σε πλασμίδια μεγάλου μεγέθους, τα πλασμίδια *Sym*. Εκτός από τα γονίδια *nod*, που αποδεδειγμένα καθορίζουν

συγκεκριμένα γεγονότα της διαδικασίας σχηματισμού φυματίων, στα πλασμίδια *Sym*, υπάρχουν επίσης και «γονίδια εξειδίκευσης», τα οποία έχουν αποφασιστικό ρόλο στο να συνταιριάζει κάθε στέλεχος του *Rhizobium* με συγκεκριμένο φυτικό ξενιστή. Αποδεδειγμένα, η εξειδίκευση μιας ομάδας διασταυρούμενου εμβολιασμού μπορεί να μεταφερθεί με απλή μεταφορά του αντίστοιχου πλασμιδίου *Sym*. (Brock 2005) Τα γονίδια του φυτού που εκφράζονται για τη δημιουργία των φυματίων ονομάζονται γονίδια φυματίνης (*nodulin*, *Nod*). Τα γονίδια των ριζοβίων που συμμετέχουν στη διαδικασία σχηματισμού των φυματίων ονομάζονται γονίδια φυματιοποίησης (*nodulation*, *nod*). Τα γονίδια *nod* των ριζοβίων κατατάσσονται σε «κοινά» γονίδια *nod* ή σε εξειδικευμένα ως προς τον ξενιστή γονίδια *nod*. Τα κοινά γονίδια *nod*, *nodA*, *nodB*, *nodC*, εντοπίζονται σε όλα τα στελέχη των ριζοβίων. Τα γονίδια εξειδίκευσης, *nodP*, *nodQ*, *nodH*, *nodF*, *nodE*, *nodL*, παρουσιάζουν διαφορές μεταξύ των στελεχών των ριζοβίων και φαίνεται να καθορίζουν το εύρος των ξενιστών, δηλαδή ποια είδη φυτών μπορούν να προσβληθούν. Μόνο ένα από τα γονίδια *nod*, το ρυθμιστικό γονίδιο *nodD*, εκφράζεται οπωσδήποτε και πάντοτε και το πρωτεϊνικό προϊόν του (*NodD*) ρυθμίζει τη μεταγραφή των άλλων γονιδίων *nod*. Τα «κοινά» γονίδια *nodA*, *nodB*, *nodC* σχετίζονται με την παραγωγή των παραγόντων *Nod*, δηλαδή εκείνων των ολιγοσακχαριτών που αποδεδειγμένα ευθύνονται για την κάμψη των ριζικών τριχιδίων και την έναρξη της διαδικασίας διαίρεσης των φυτικών κυττάρων, η οποία καταλήγει στον σχηματισμό των ριζικών φυματίων. Οι παράγοντες *Nod* (*Nod factors*) είναι ολιγοσακχαρίτες λιποχιτίνης που δρουν ως μόρια- ειδικά σήματα. Όλοι έχουν έναν σκελετό χιτινο-β-1→4-συνδεδεμένης N-ακετυλο-D-γλυκοζαμίνης, με μήκος από τρία έως έξι μόρια σακχάρων, και μία αλυσίδα λιπαρών οξέων στη θέση C-2 του μη αναγωγικού σακχάρου. Απλοποιημένα δηλαδή, πρόκειται για έναν σκελετό N-ακετυλογλυκοζαμίνης στον οποίο δεσμεύονται διάφοροι υποκαταστάτες. Για τη σύνθεση αυτής της βασικής δομής απαιτούνται τα γονίδια *nodABC* που κωδικοποιούν τα ένζυμα *NodABC*. Πιο συγκεκριμένα, το *NodA* είναι μια N-ακυλοτρανσφεράση που η καταλυτική της δράση αφορά την προσθήκη της ακυλο-αλυσίδας των λιπαρών οξέων. Το *NodB* είναι μια απακετυλάση χιτίνης-ολιγοσακχαρίτη που, αντίστοιχα, αφαιρεί την ακέτυλο-ομάδα από το ακραίο μη αναγωγικό σάκχαρο. Τέλος, το *NodC* είναι μια συνθάση χιτίνης-ολιγοσακχαρίτη που καταλύει τη σύνδεση των μονομερών της N-ακετυλο-D-γλυκοζαμίνης. Τα γονίδια τα εξειδικευμένα ως προς τον ξενιστή *nodP*, *nodQ*, *nodH*, *nodF*, *nodE*, *nodL*, εμφανίζουν ποικιλία στα διάφορα στελέχη και έχουν την πληροφορία για τη σύνθεση ένζυμων που συμμετέχουν στην τροποποίηση της ακυλοαλυσίδας των λιπαρών οξέων ή στην προσθήκη συγκεκριμένων ομάδων που είναι σημαντικές για την αναγνώριση του ξενιστή. Έτσι, η εξειδίκευση του κάθε στελέχους ως προς το φυτό-ξενιστή καθορίζεται από την συγκεκριμένη δομή του παράγοντα *Nod* που σχετίζεται με την παραγωγή του εκάστοτε είδους ριζοβίου, συμπεριλαμβανομένων των χημικών παραλλαγών του θεμελιώδους σκελετού των παραγόντων *Nod* μέσω της έκφρασης των εξειδικευμένων γονιδίων.



Εικόνα 1.3: Γενική δομή παραγόντων *nod*.

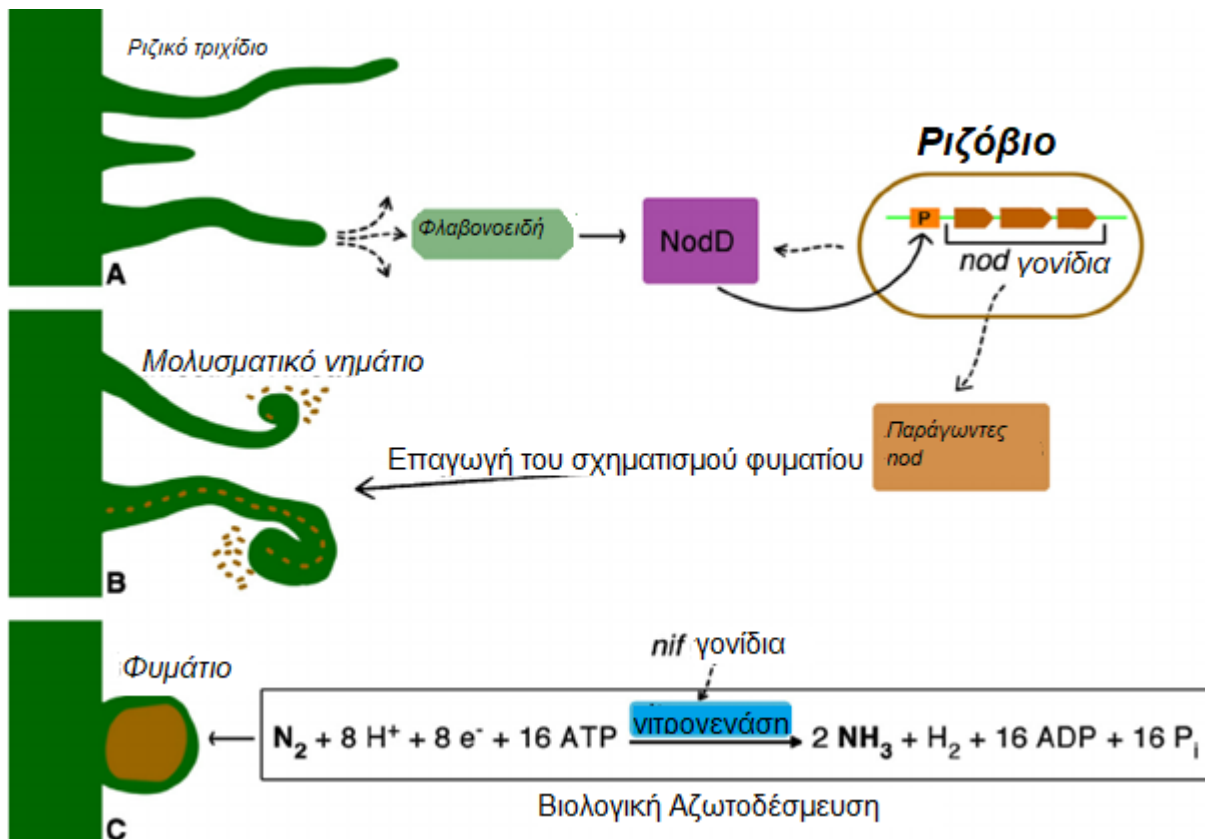
Οι παράγοντες nod είναι λιποχιτινικοί ολιγοσακχαρίτες. Η αλυσίδα των λιπαρών οξέων έχει συνήθως 16 έως 18 άτομα άνθρακα. Ο αριθμός των επαναλαμβανόμενων μεσαίων τμημάτων (n) είναι συνήθως 2 ή 3.

1.1.6 Ανταλλαγή σημάτων κατά την εγκαθίδρυση της συμβίωσης

Το πρώτο στάδιο για τη δημιουργία της συμβιωτικής σχέσης των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων και των ξενιστών τους είναι προσκόλληση των βακτηρίων στις ριζικές τους επιφάνειες που ακολουθεί τη μετανάστευση τους και κυρίως γύρω από τη ζώνη επιμήκυνσης της ρίζας και γύρω από τα ριζικά τριχίδια (Reis et al 2000). Η μετανάστευση αυτή αποτελεί μία χημειοτακτική ανταπόκριση που την προκαλούν χημικές προσελκύστηκες ουσίες, ιδιαιτέρως (ισο)φλαβονοειδή και βεταΐνες που εκκρίνονται από τις ρίζες του φυτού. Αυτοί οι παράγοντες προσέλκυσης ενεργοποιούν την πρωτεΐνη NodD, η οποία στη συνέχεια επάγει τη μεταγραφή των απαραίτητων υπόλοιπων γονιδίων nod (Phillips & Kapulnik 1995). Αυτό εξασφαλίζεται επειδή ο υποκινητής όλων των γονιδίων nod, εκτός αυτού του γονιδίου nodD, περιλαμβάνει μία εξαιρετικά συντηρημένη αλληλουχία που ονομάζεται πλαίσιο ή κουτί nod. Η πρόσδεση της ενεργοποιημένης πρωτεΐνης NodD στο κουτί nod επάγει τη μεταγραφή όλων των υπόλοιπων γονιδίων nod. Επομένως, η πρωτεΐνη NodD αποτελεί ένα είδος θετικού ρυθμιστή. Τα σημαντικότερα μόρια-επαγωγείς είναι τα φυτικά φλαβονοειδή, οργανικά μόρια με πλήθος διακριτών λειτουργιών, όπως ο έλεγχος της ανάπτυξης, η προσέλκυση επικονιαστικών εντόμων και ο έλεγχος των ζιζανίων. Τα ψυχανθή όμως εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες φλαβονοειδών στις ρίζες τους, ώστε να ενεργοποιηθεί η έκφραση γονιδίων nod στα γειτονικά ριζόβια του εδάφους. Μερικά φλαβονοειδή που ομοιάζουν έντονα από δομική άποψη με τα μόρια-επαγωγείς του nodD, αντί να επάγουν, αναστέλλουν την έκφραση γονιδίων nod σε ορισμένα είδη ριζοβίων. Αυτό το εύρημα υποδηλώνει ότι η εξειδίκευση που παρατηρείται μεταξύ φυτού και βακτηρίου στη συμβιωτική σχέση ψυχανθούς – *Rhizobium* μπορεί, εν μέρει τουλάχιστον, να οφείλεται στη χημική δομή των συγκεκριμένων φλαβονοειδών που εκκρίνονται από το φυτό.

1.1.7 Βακτηριοειδή και έναρξη αζωτοδέσμευσης

Οι παράγοντες Nod είναι υπεύθυνοι για την κάμψη και την αυξητική συστροφή των εκφυόμενων ριζικών τριχιδίων. Μέσα στις εγκολπώσεις που δημιουργούνται, πολλαπλασιάζονται τα ριζόβια. Τότε, επάγεται ο σχηματισμός του νηματίου μόλυνσης ή νηματίου προσβολής (infection thread), ενός σωληνοειδούς αγωγού από κυτταρίνη, ο οποίος παράγεται μέσω σύντηξης των κυστιδίων Golgi των ριζικών κυττάρων και εκτείνεται σε όλο το μήκος του ριζικού τριχιδίου. Ως αποτέλεσμα, εξαπλώνεται η μόλυνση από τα μολυσμένα ριζικά τριχίδια προς όλο και περισσότερα υγιή κύτταρα των γειτονικών τμημάτων της φυτικής ρίζας. Παράλληλα, οι παράγοντες Nod διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων της ρίζας, διαδικασία που καταλήγει στον σχηματισμό του φυματίου. Στο εσωτερικό των φυτικών κυττάρων, τα ριζόβια πολλαπλασιάζονται ταχύτατα και μετασχηματίζονται σε διογκωμένες, παραμορφωμένες και διακλαδισμένες δομές που ονομάζονται βακτηριοειδή (bacteroids). Αυτά τα ενδοσυμβιωτικά οργανίδια αζωτοδέσμευσης, περικλείονται το καθένα χωριστά ή σε μικρές ομάδες, από τμήματα κυτταροπλασματικής μεμβράνης του φυτικού κυττάρου, ονομάζεται περιβακτηριοειδής μεμβράνη, και σχηματίζουν μορφώματα που φέρουν τη συλλογική ονομασία συμβιώσωμα. Το συμβιώσωμα είναι, δηλαδή, μια ομάδα βακτηριοειδών που περιστοιχίζονται από την ίδια φυτικής προελεύσεως μεμβράνη. Μόνο μετά τον σχηματισμό του συμβιωσώματος μπορεί να ξεκινήσει η αζωτοδέσμευση. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι μέσα στα βακτηριοειδή εντοπίζεται η αζωτάση, η οποία δεν απελευθερώνεται στο φυτικό κυτταρόπλασμα.



Εικόνα 1.3: Σχηματική αναπαράσταση ανταλλαγής σημάτων κατά την εγκαθίδρυση της συμβίωσης.

A. Φλαβονοειδή εκκρίνονται από τις ρίζες των ψυχανθών, προάγοντας την έκφραση του γονιδίου *nodD*, που με τη σειρά του και μέσω της πρωτεΐνης NodD που προσδέεται στο κουτί *nod* προωθεί την έκφραση των υπολοίπων *nod* γονιδίων.

B. Τα *nod* γονίδια παράγουν τους παράγοντες Nod, οι οποίοι σηματοδοτούν την έναρξη του σχηματισμού φυματίου, μέσω της συστροφής των ριζικών τριχιδίων και της εγκόλπωσης των ριζοβίων σε αυτά.

C. Σχηματισμός φυματίου και έναρξη βιολογικής αζωτοδέσμευσης μέσω του ενζυμικού συμπλόκου της νιτρογενάσης.

1.1.8 Γονίδια Αναφοράς στα ριζόβια αντίδραση

1.1.8.1 Γλουταμινική Συνθεάση

Η γλουταμινική συνθεάση (GS) αναλαμβάνει την κατάλυση της χημικής αντίδρασης που παράγει γλουταμίνη από το γλουταμινικό οξύ και την αμμωνία. Το γονίδιο που ρυθμίζει την έκφρασή της βρίσκεται στον πυρήνα του κυττάρου. Επιπλέον, η GS επιτελεί την αντίστροφη αντίδραση, γνωστή ως "αντίδραση μεταφοράς 7-γλουταμυλίου", που μεταφέρει το 7-γλουταμύλιο από τη γλουταμίνη στην υδροξυλαμίνη, δημιουργώντας 7-γλουταμινικό υδροξυαμικό οξύ και άλλες ουσίες.

Τέλος, η GS ρυθμίζει τα επίπεδα αζώτου σε μόρια όπως το DNA και τα αμινοξέα, προμηθεύοντας άζωτο από τη γλουταμίνη που παράγεται κατά τη διαδικασία σύνθεσης και μεταφέροντάς το σε μόρια που

χρειάζονται. Επίσης, η GS μπορεί να επηρεάσει τη μεταφορά αζώτου σε μόρια πλούσια σε άζωτο και την παραγωγή ορισμένων αμινοξέων και νουκλεοτιδίων, όπως η μονοφωσφορική αδενοσίνη (AMP), η ιστιδίνη και η αλανίνη, μειώνοντας τη σύνθεσή τους σε περίπτωση περισσειάς. Η GS είναι παρούσα τόσο στα φυτά όσο και στα ζώα, καθώς και σε προκαρυωτικούς οργανισμούς. Στα φυτά, αποτοξινώνει την αμμωνία, ενώ στα ζώα ανακυκλώνει τα μόρια των νευροδιαβιβαστών αμινοξέων και αποτοξινώνει την αμμωνία. (Goodsell(2002))

1.1.8.2 ATP συνθετάση

Οι συνθέσεις ATP είναι πολυπρωτεϊνικά σύμπλοκα που βρίσκονται σε μεμβράνες των βακτηρίων, των χλωροπλάστων και των μιτοχόνδριων. Η εκφρασή τους γονιδίου εδράζεται στον πυρήνα. Χρησιμοποιούν μία διαμεμβρανική πρωτονοκινητήριο δύναμη, p , ως πηγή ενέργειας για την κίνηση ενός μηχανικού περιστροφικού μηχανισμού που οδηγεί στη χημική σύνθεση ATP από ADP. Η συνολική αρχιτεκτονική, η οργάνωση και η μηχανική τους αρχή είναι ως επί το πλείστον καθιερωμένες, αλλά άλλα χαρακτηριστικά είναι λιγότερο καλά κατανοητά. Για παράδειγμα, οι συνθέσεις ATP από βακτήρια, μιτοχόνδρια και τους χλωροπλάστες διαφέρουν ως προς τους μηχανισμούς της ρύθμισης της δραστηριότητάς τους, και οι μοριακές βάσεις αυτών των διαφορετικών μηχανισμών και οι φυσιολογικοί τους ρόλοι είναι μόλις αρχίζουν να αναδύονται. Συνθέσεις ATP από πολυκύτταρους οργανισμούς απαιτούν λιγότερη ενέργεια, ενώ η ενέργεια που απαιτείται για την παραγωγή ενός μορίου ATP σε μονοκύτταρους οργανισμούς και στους χλωροπλάστες είναι υψηλότερη. Walker, John E. (2013).

1.1.8.3 Ρεκομπινάση A

Η *RecA* είναι το καθοριστικό μέλος μιας αρχαίας και πανταχού παρούσας ομάδας πρωτεϊνών ανασυνδιασμού αλυσίδων DNA που είναι απαραίτητες για τον ομόλογο ανασυνδυασμό. Αυτή η ομάδα αποτελείται από τρεις διαφορετικές οικογένειες: *RecA*, *RAD51* και τα *RAD51-παράλογα*. Η *RecA* βρίσκεται σε όλα τα ελεύθερα ζώντα βακτήρια και είναι το πιο αργά εξελισσόμενο γονίδιο που εμπλέκεται στον μεταβολισμό του DNA, με μέση διατήρηση αλληλουχίας ~60-70% σε ολόκληρο το βακτηριακό βασίλειο

1.2. Φυλογένεια συμβιωτικών ριζοβίων

1.2.1 Τα κυριότερα γένη ριζοβίων στα ψυχανθή

Τα περισσότερα είδη ριζοβίων κατανέμονται σε έξι γένη των α -πρωτεοβακτηρίων (*a-Proteobacteria*). Στα ταχείας και μετρίως ταχείας ανάπτυξης γένη των *Rhizobium*, *Allorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, στο βραδείας ανάπτυξης γένος *Bradyrhizobium* και το βασικό γένος που αποτελεί τον «κορμό» στη δημιουργία φυματίων το γένος *Azorhizobium*. Υπάρχουν όμως και ερευνητικά δεδομένα που αποδεικνύουν την ύπαρξη και ριζοβίων και σε άλλες τάξεις των *Proteobacteria*, κάποια ανήκουν στα β -πρωτεοβακτήρια (Chen et al., 2005, Vandamme et al., 2002), στα γ -πρωτεοβακτήρια (Ibanez et al., 2009, Muresu et al. 2010), καθώς και στα ακτινοβακτήρια (Palaniappan et al., 2010, Trujillo et al., 2010). Η ποικιλότητα των ριζοβίων επηρεάζεται τόσο από αβιοτικούς παράγοντες όπως η θερμοκρασία, το pH του εδάφους, η αλατότητα, όσο και από βιοτικούς παράγοντες όπως η κατανομή των διαφόρων φυτών-

ξενιστών σε ένα οικοσύστημα. Η γενετική ποικιλότητα και η χωροταξική κατανομή των ριζοβίων που σχηματίζουν φυμάτια, πρέπει να αντανακλούν και να αντικατοπτρίζουν την αλληλεπίδραση και τη συμμετοχή αναμεταξύ των βακτηρίων του εδάφους στα πλαίσια μιας ριζόσφαιρας. Ωστόσο, οι αναλυτικοί μηχανισμοί της παραγωγής και της διατήρησης της ποικιλομορφίας των ριζοβίων στον αγρό δεν είναι ακόμη γνωστοί (Shiraishi, 2011). Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ο σχηματισμός φυματίων στο ριζικό σύστημα γενικότερα ψυχανθών φυτών είναι ικανός να πραγματοποιείται με τη συνεισφορά ποικίλων ειδών ριζοβίων. Στις μέρες μας, τα ριζόβια που σχετίζονται με την συμβιωτική αζωτοδέσμευση ταξινομούνται στα γένη που αναγράφονται στον Πίνακα 1.1 (Vandamme et al. 2002, Benhizia et al. 2004, Rasolomampianina et al. 2005, Williems 2006, Martinez-Romero et al 2010, Shiraishi et al. 2010, Weir 2011).

Πίνακας 1.1: Τα συνηθέστερα γένη ριζοβίων που απαντώνται γενικά στα ψυχανθή φυτά
<i>Agrobacterium</i>
<i>Mesorhizobium</i>
<i>Rhizobium</i>
<i>Allorhizobium</i>
<i>Methylbacterium</i>
<i>Ralstonia</i>
<i>Azorhizobium</i>
<i>Ochrobactrum</i>
<i>Shinella</i>
<i>Devosia</i>
<i>Phyllobacterium</i>
<i>Sinorhizobium</i>
<i>Pseudomonas</i>

Μεταξύ αυτών των γενών, το φυτό *Robinia pseudoacacia* έχει βρεθεί ότι δημιουργεί συμβιωτικές σχέσεις με διάφορα είδη ριζοβίων συγκεκριμένων γενών τα οποία αναγράφονται στον Πίνακα 1.2 (Ulrich and Zaspel 2018, Han et al. 2008, Wei et al. 2009, Mierzwa et al. 2010).

Πίνακας 1.2: Τα συνηθέστερα γένη ριζοβίων που απαντώνται συγκεκριμένα στο <i>Robinia pseudoacacia</i>:
<i>Mesorhizobium</i>
<i>Rhizobium</i>
<i>Sinorhizobium</i> .

1.2.2 Τα κυριότερα γένη ριζοβίων στο φυτό *Robinia pseudoacacia*

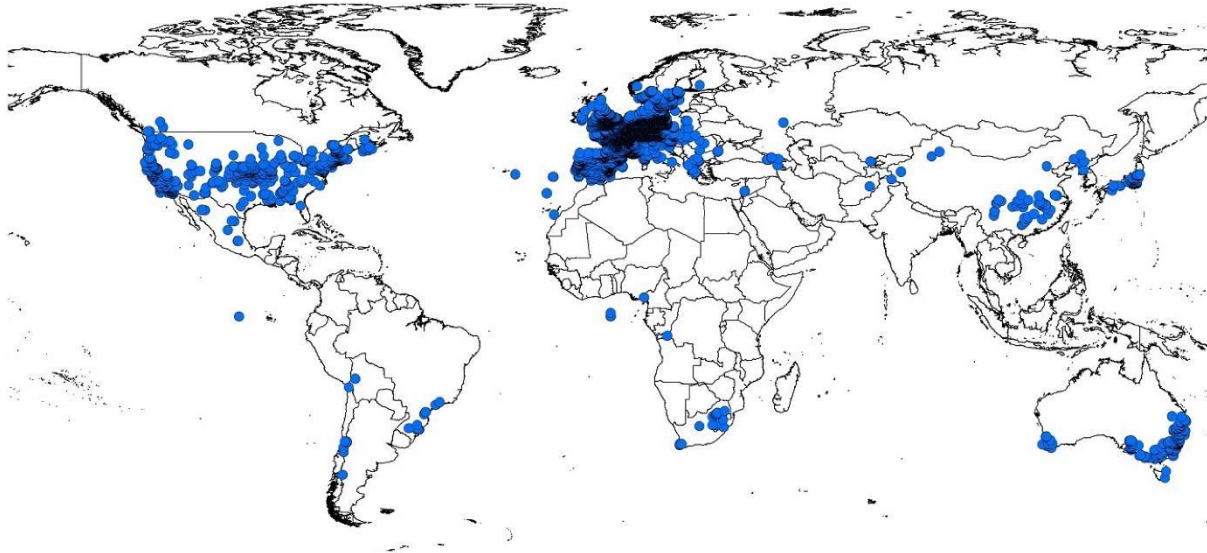
Η *R. pseudoacacia* προέρχεται από τη Βόρειο Αμερική και πρωτοεμφανίστηκε στην Ευρώπη τον 17ο αιώνα. Μέσω φυλογενετικής ανάλυσης και με βάση την ποικιλομορφία των ενδοσυμβιωτικών του μικροοργανισμών, επιβεβαιώεται το γεγονός ότι ιθαγενή στελέχη ριζοβίων μπορεί να συσχετίζονται με το φυτό (Ulrich and Zaspel, 2018). Ύστερες μελέτες αναφέρουν την παρουσία ποικίλων ειδών του γένους *Mesorhizobium* και προκύπτει πως αυτά μπορεί να είναι τα κυρίαρχα βακτήρια που δραστηριοποιούνται στις αζωτοδεσμευτικές διεργασίες στις ρίζες των φυτών *Robinia* (Mierzwa et al., 2009, 2010b, Wei et al., 2009). Σε επόμενη μελέτη που αφορά τη γενετική ποικιλομορφία ριζοβίων σχετικών με ενδημικά ψυχανθή φυτά, το 55% των απομονώσεων-δειγμάτων ανήκε πράγματι στο γένος *Mesorhizobium*. Τα δείγματα της συγκεκριμένης μελέτης ταξινομήθηκαν στο γένος *Rhizobium* (κατά 15%), στο είδος *E. medicae* (3%) και σε ένα δυνητικά νέο γένος συγγενικό με το *Rhodopseudomonas* και το *Bradyrhizobium* (κατά 27%) (Meyer S. et al., 2011)

1.3 ΤΟ ΦΥΤΟ *Robinia pseudoacacia*

1.3.1 Ταξινόμηση και ιστορικά δεδομένα

Το φυτό *Robinia pseudoacacia* με κοινή ονομασία: black locust ή στα ελληνικά ροβίνια η ψευδοακακία, έχει συστηματική ταξινόμηση: Συνομοταξία αγγειοσπέρμων (*Angiosperms*), Τάξη κυαμοδών (*Fabales*), Οικογένεια κυαμοειδών (*Fabaceae*), και Γένος ροβίνια (*Robinia L.*). Η ροβίνια η ψευδοακακία αποτελεί ενδημικό είδος της Βορείου Αμερικής, το οποίο εισήλθε πρωτίστως στην Γαλλία στις αρχές του 17ου αιώνα και εν συνεχεία εξαπλώθηκε στην υπόλοιπη Ευρώπη αλλά και την Ασία (Sitzia et al., 2016). Πρόκειται για ψυχανθές φυτό που σταφυμάτια στις ρίζες του συμβιώνουν ποικίλα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια. Τα ριζόβια αυτά δεσμεύουν το ατμοσφαιρικό άζωτο, το οποίο είναι σε μη αφομοιώσιμη μορφή από το φυτό, και το μετατρέπουν σε αμμωνιακά ιόντα, τα οποία μπορούν να αφομοιωθούν από το φυτό-ξενιστή, προάγοντας έτσι την ανάπτυξή του. Η συμβιωτική αυτή σχέση, μεταξύ φυτού ροβίνιας και ριζοβίων, καθιστά το φυτό-ξενιστή ικανό να αναπτυχθεί σε εδάφη φτωχά σε θρεπτικά συστατικά, όπως παράκτιες αμμώδεις περιοχές, και επιπλέον καθιστά το φυτό ιδιαίτερος σημαντικό σε οικονομικό και οικολογικό επίπεδο. Εξαιτίας αυτής της προαναφερθείσας δυνατότητας συμβίωσης, δένδρα του φυτού της *R.pseudoacacia* έχουν ευρέως φυτευτεί για λόγους αναδάσωσης, αλλά ακόμα και διαμόρφωσης τοπίου σε περιοχές της Βορείου Αμερικής, της Ασίας, αλλά και της Ευρώπης (Allen and Allen 1981., Flint 1983). Σε γενικές γραμμές μπορεί να θεωρηθεί ακόμα και ως ζιζάνιο σε καλλιέργειες καθώς αναπτύσσεται πολύ ανταγωνιστικά όπως θα

αναφέρουμε στην συνέχεια. Στην Ελλάδα το φυτό έχει εγκλιματιστεί πλήρως, ενώ συχνά το βρίσκουμε ακόμα και στα παρτέρια των δρόμων, ως καλλωπιστικό φυτό.



Εικόνα 1.5 Γεωγραφική εξάπλωση της *R.pseudoacacia*

1.3.2 Περιγραφή χαρακτηριστικών

Η *R. pseudoacacia* αποτελεί μικρού-μεσαίου μεγέθους φυλλοβόλο δέντρο, με ευθυτενή σχετικά κορμό με μια ανοιχτή κορυφή. Τα δέντρα *R. pseudoacacia* συνήθως φτάνουν σε ύψος 12-17 m, κάτω όμως από ιδανικές συνθήκες έχουν σημειωθεί να φτάνουν μέχρι και τα 30 m. Η διάμετρος του κορμού μπορεί να φτάσει μέχρι τα 76 cm (Immelman et al. 1973, Converse 1984, Orwa et al. 2009). Τα νεαρά δέντρα χαρακτηρίζονται από πληθώρα αιχμηρών αγκαθιών στους μίσχους των βλαστών και κλαδιών (Εικόνα 1.4) και λείο φλοιό ερυθρού χρωματισμού, ο οποίος με την πάροδο του χρόνου σκουραίνει. (Orwa et al. 2009).



Εικόνα 1.6: Δέντρο *R. pseudoacacia*

Τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα του φυτού είναι τα συνεχόμενα και ιδιαιτέρως κοφτερά αγκάθια, καθώς και το ερυθρό χρώμα στο βλαστό. Τα φύλλα του δέντρου είναι σύνθετα και αποτελούνται από 7-19 φυλλάρια, συμπεριλαμβανομένου του ακραίου φυλλαρίου, το χρώμα τους είναι είτε βαθύ πράσινο, είτε ανοιχτό πράσινο, έχουν χνουδι, είναι λεία στην περιφέρεια του ελάσματος και τοποθετούνται εναλλάξ κατά μήκος του μίσχου (Converse 1984). Η *R. pseudoacacia* έχει στενά και ωοειδή φυλλάρια, με μήκος 1.5-5 cm, πλάτος 1.2-1.8 cm, με το μέρος που πλησιάζει τον κεντρικό μίσχο, ο οποίος έχει μήκος 20-30 cm, να είναι φαρδύτερο. Παρουσιάζονται δύο αγκάθια στη βάση κάθε φύλλου ή στους κόμβους των βλαστών (Orwa et al. 2009). Τα άνθη του δένδρου έχουν μήκος 15-20 mm, ομοιάζουν με του μοσχομπίζελου, έχουν έντονο άρωμα και έχουν λευκό, κιτρινωπό ή ροζ χρωματισμό ανάλογα με την ποικιλία. Δημιουργούνται σε πυκνές ταξιανθίες μήκους περίπου 14 cm, περιλαμβάνουν άνω των 14 άνθων, προέρχονται από βλαστούς εκείνης της χρονιάς και βρίσκονται συχνά κοντά στην άκρη ενός νέου βλαστού (Orwa et al. 2009). Οι παραγόμενοι καρποί είναι επιμήκεις μήκους 7-10 cm, οι οποίοι είναι πεπλατυσμένοι και λείοι με δερμάτινη υφή, με σκούρο καφέ προς ερυθρό-καφέ χρώμα. (Converse 1984). Ορισμένοι καρποί παράγονται σε κεντρικό βλαστό. Οι καρποί δεν πέφτουν από το δένδρο κατά τη διάρκεια του χειμώνα άλλα παραμένουν πάνω και μπορεί να παραμείνουν εκεί για πάνω από ένα χρόνο. Σε κάθε καρπό περιέχονται συνήθως 5-8 σπόροι μήκους 3-5 mm, οι οποίοι είναι σκούροι, πεπλατυσμένοι, σε σχήμα νεφρού και περικλείονται από ένα σκληρό και αδιαπέραστο επίστρωμα (Orwa et al. 2009). Η *R. pseudoacacia* δημιουργεί συνήθως ένα ευρύ ριζικό σύστημα, βάθους 5-7 m, με δυνατές δεσμευτικές ικανότητες (Hanover 1990). Το ριζικό της σύστημα είναι ινώδες και αναπτύσσεται ταχέως, σε ξηρά έως μέτριας υγρασίας εδάφη και σε pH εδάφους 5.1 – 8.5 (ευρύ φάσμα).



Εικόνα 1.7 Απεικόνιση ανθέων και καρπών της *Robinia pseudoacacia*. Αριστερά. Η ταξιανθία με τα λευκά άνθη και φυλλάρια. Δεξιά. Οι λοβώδεις σκουρόχρωμοι καρποί.

1.3.3: Συνθήκες ανάπτυξης

Η *R. pseudoacacia* φύτεται συνήθως ως ένα μικρό έως μεσαίου μεγέθους δένδρο με έναν κεντρικό κορμό, ο οποίος φθάνει σε ύψος από 12-17 m όπως αναφέρθηκε προηγουμένως. Ωστόσο, σε βραχώδεις περιοχές, όπως οι πρόποδες της νότιας πλευράς των Άλπεων, αναπτύσσεται συχνά ως θάμνος (Cierjacks et al., 2013).

1.3.3.1 Κλιματικές απαιτήσεις

Οι περιοχές από τις οποίες προέρχεται το φυτό, χαρακτηρίζονται από κλιματική άποψη ως περιοχές με μέτρια έως και υψηλά επίπεδα υγρασίας (Huntley 1990). Στις περιοχές αυτές περιλαμβάνονται ψυχρά και υγρά δάση, αλλά και ζεστά και υγρά δάση. Το χειμώνα η θερμοκρασία κυμαίνεται μεταξύ -4-7ο C, ενώ το καλοκαίρι μεταξύ 18-27 ο C (Huntley 1990, Stone 2009). Στα εισαγόμενα φυτά, οι κλιματικές συνθήκες μπορεί να είναι διαφορετικές. Για παράδειγμα, το φυτό μπορεί να αναπτυχθεί σε συνθήκες υψηλότερης ξηρασίας, όπως εδάφη στο Ισραήλ και την Κύπρο (Converse 1984), σε ψυχρότερες θερμοκρασίες (-8ο C), αλλά και σε υψηλότερες θερμοκρασίες (38 ο C) στο New Mexico των ΗΠΑ (Stones 2009).

1.3.3.2 Εδαφικές απαιτήσεις

Στις περιοχές από τις οποίες προέρχεται το φυτό, είναι ικανό να αναπτύσσεται σε ευρεία γκάμα ποικίλων τύπων εδαφών, ακόμη και σε εξαιρετικά ξηρά και συμπαγή εδάφη (Converse 1984). Σε ιδανικές συνθήκες ανάπτυξης το φυτό προτιμά υγρά και εύφορα εδάφη, ή εδάφη ασβεστολιθικής προέλευσης. Η ύπαρξή του συνηθίζεται σε πλαγιές με υψόμετρο κάτω από 1350 m (Huntley 1990). Στα εισαγόμενα φυτά, υπάρχει η δυνατότητα ανάπτυξης σε μεγαλύτερη ποικιλία εδαφών. Για παράδειγμα, στην Γερμανία έχει παρατηρηθεί να αναπτύσσεται σε αμμώδη εδάφη με pH 3.2. Στην κεντρική και δυτική Ευρώπη, εισβάλλει σε εδάφη ξηρά και φτωχά σε θρεπτικά συστατικά, καθώς και περιβάλλοντα ημι-ξηρασίας. Ωστόσο, δεν αναπτύσσεται καλά σε τέτοια φτωχά εδάφη (Converse 1984). Η *R.pseudoacacia* φυτεύεται και εγκαθίσταται σε διαταραγμένες περιοχές, συμπεριλαμβανομένων χώρων υγειονομικής ταφής (Kim and Lee 2005), περιοχών αποκατάστασης ορυχείων (Huntley 1990), καθώς και περιοχών που κινδυνεύουν από διάβρωση. Γίνεται κατανοητή λοιπόν η οικολογική της σημασία για τον άνθρωπο.

1.3.4 Αναπαραγωγή

1.3.4.1 Άνθιση και καρπόδεση

Η *R.pseudoacacia* ανθίζει συνήθως στο τέλος της άνοιξης έως νωρίς το καλοκαίρι (Μάιο με Ιούνιο). Τα άνθη εμφανίζονται έναν μήνα μετά την εμφάνιση των πρώτων φύλλων (Converse 1984). Η παραγωγή καρπών ξεκινά συνήθως όταν το δένδρο είναι σε ηλικία 6 ετών, ωστόσο υψηλότερη παραγωγή επιτυγχάνεται σε δένδρα ηλικίας μεταξύ 15 και 40 ετών. Η παραγωγή καρπών συνεχίζεται μέχρι και την ηλικία των 60 ετών (Huntley 1990). Η ετήσια παραγωγή ποικίλλει, με τα υψηλότερα επίπεδα να παρατηρούνται κάθε δύο χρόνια. Τα φυτά της ροβίνιας μπορούν να αποδώσουν από 7 έως 15 kg σπόρων ανά 45 kg καρπών (Converse 1984).

1.3.4.2 Επικονίαση

Τα άνθη της ροβίνιας είναι ερμαφρόδιτα, περιέχουν δηλαδή και τα δύο φύλλα μαζί (στήμονες και ύπερους), πρωτίστως γονιμοποιούνται από υμενόπτερα, αλλά μπορούν να βοηθήσουν στην επικονίαση και άλλοι τύποι εντόμων (Converse 1984, Surles et al. 1990). Η γύρη τοποθετείται στο μπουμπούκι και η αυτεπικονίαση αποτρέπεται από ένα δακτύλιο με όρθιες τρίχες που προστατεύει το στίγμα (Converse

1984). Επιπροσθέτως, η γύρη από τις όρθιες τρίχες μεταφέρεται στο έντομο, ώστε να διασκορπιστεί και σε άλλα άνθη (Orwa et al. 2009).

1.3.4.3 Παραγωγή σπερμάτων

Ο διασκορπισμός των σπερμάτων σε μεγάλη απόσταση μακριά από τα ενήλικα φυτά πραγματοποιείται μέσω του νερού, των πτηνών και άλλων ζώων (Gilman and Watson 1994, Coulson 2015). Τα σπέρματα της ροβίνιας παρουσιάζουν αξιοσημείωτη αδράνεια και είναι δυνατόν να βρίσκονται στο έδαφος ανενεργά για πάνω από 88 χρόνια (Voss and Edward 1985, Stone 2009). Ως αποτέλεσμα της αδράνειας των σπερμάτων, η ροβίνια μπορεί να συσσωρεύει τεράστια αποθέματα μακρόβιων σπερμάτων, χρησιμεύοντας ως «τράπεζα» σπόρων (Stone 2009).

1.3.4.4 Πολλαπλασιασμός

Ο πολλαπλασιασμός της ροβίνιας γίνεται τοπικά κυρίως μέσω της αναπαραγωγής από σπόρους ή από ριζικά μοσχεύματα. Η βλάστηση συνήθως προέρχεται από το ευρύ πλευρικό ριζικό της σύστημα, είτε από τυχαίους οφθαλμούς στη βάση του κεντρικού κορμού (Boring and Swank 1984, Gyokusen et al. 1991). Συνήθως συσχετίζεται με ζημιές που προκαλούνται από κοψίματα, πυρκαγιές, άνεμο, κόψιμο ξύλων ή από ασθένειες. Η βλάστηση από τις ρίζες συνήθως συμβαίνει όταν το δένδρο γίνει 5 ετών (Huntley 1990, Stone 2009). Η βλάστηση αυτή ενισχύεται όταν τα δένδρα αναπτύσσονται σε ανοιχτές περιοχές με υψηλή ηλιοφάνεια και σε αμμώδη εδάφη (Stone 2009). Τα δένδρα της ροβίνιας σχηματίζουν σημαντικά πλευρικά ριζικά συστήματα, τα οποία μπορούν να εξαπλωθούν και να φτάσουν ακόμη και τα 50 m (Phillips and Shure 1990). Ιδιαίτερη προσοχή απαιτεί καθώς οι σπόροι εξαπλώνονται εύκολα και πρόκειται για επεκτατικό φυτό παράγοντας άλσος από βλαστούς. Χαρακτηρίζεται ως αλληλοπαθητικό φυτό, καθώς μπορεί να απελευθερώσει χημικές ουσίες στο έδαφος που θα αναστείλουν την ανάπτυξη άλλων φυτών. Φαίνεται ότι εκτός από το φαινόμενο της αλληλοπάθειας, το οποίο παρατηρείται μόνο σε πειράματα στο εργαστήριο (Nasir et al., 2005), οι αλλαγές που σχετίζονται με τη σύνθεση των ειδών σε ένα οικοσύστημα, οφείλονται κυρίως σε αλλαγές στην διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών στο έδαφος και στις συνθήκες φωτισμού (Vitkova., 2010). Η κύρια πηγή αζώτου στα φυτά *Robinia*, προέρχεται από την διαδικασία της αζωτοδέσμευσης των συμβιωτικών ριζοβίων, λόγω της αργής αποσύνθεσης του λεπτού στρώματος των φύλλων, εξαιτίας της υψηλής περιεκτικότητας σε λιγνίνη (Castro-Diez et al., 2012). Υψηλότερα επίπεδα δραστηριοποίησης νιτρογενάσης παρατηρούνται μεταξύ Ιουνίου και Σεπτεμβρίου (Noh et al., 2010). Σε περιβάλλον ιδανικής υγρασίας, το άζωτο στο έδαφος αυξάνεται, με αποτέλεσμα να αυξάνονται τα επίπεδα δημιουργίας φυματίων. Ως αποτέλεσμα της υψηλής νιτροποίησης του εδάφους, μειώνεται το pH του εδάφους και αυτό οδηγεί σε υψηλότερα επίπεδα πρόσληψης ιόντων (Ca, Mg, K, Na, PO₄) (Van Miegroet and Cole., 1984., Vitkova et al., 2015).

1.3.5 Εφαρμογές και χρήσεις

Αποτελεί ένα ταχέως αναπτυσσόμενο και ισχυρό φυτό, γνωστό για την εξαιρετική ξυλεία του καθότι είναι πολύ ανθεκτικό στη σήψη. Για παράδειγμα, οι στύλοι φραχτών μπορούν να διαρκέσουν 70-100 χρόνια στο έδαφος χωρίς να σαπίζουν. Οι κύριες χρήσεις του, λοιπόν, σχετίζονται με παραγωγή ξύλου θέρμανσης και

ξύλου κατασκευών (πάσσαλοι, στύλοι, ξυλεία σκαφών, κιβώτια, κλπ.). Επιπροσθέτως, τα πλούσια άνθη του χρησιμοποιούνται ως βρώσιμα λουλούδια μαγειρεμένα, ή σε μαρμελάδες. Εφαρμογές βρίσκει ακόμη σε αφηνήματα για τσάι ή κρασί. Επίσης, είναι γνωστό και για την μελισσοκομική του αξία, αφού προσελκύει και παρέχει καταφύγιο σε επωφελή έντομα όπως μέλισσες, χρυσωπές, παρασιτοειδείς σφήκες, αλλά και πτηνά και μικρά θηλαστικά. Τέλος, χρησιμοποιείται ως ζωοτροφή, καθώς στα φύλλα του συσσωρεύονται υψηλά ποσοστά πρωτεϊνών. Πρόκειται για εξαιρετική επιλογή για την αναγέννηση φτωχού ή μολυσμένου εδάφους, καθώς συσσωρεύει υψηλά ποσοστά αζώτου, καλίου και ασβεστίου και παράγει μεγάλες ποσότητες οργανικής ύλης σε σύντομο χρονικό διάστημα. Εν κατακλείδι, ενδείκνυται για τον έλεγχο της διάβρωσης του εδάφους, καθώς το ινώδες ριζικό του σύστημα συμβάλλει στη σταθεροποίηση επιρρεπών στη διάβρωση εδαφών.

1.4 Αλατότητα

1.4.1 Το πρόβλημα της αλατότητας του εδάφους

Η αλατότητα του εδάφους αποτελεί ένα σημαντικό παγκόσμιο ζήτημα λόγω των δυσμενών επιπτώσεών της στη γεωργική παραγωγικότητα και βιωσιμότητα. Τα προβλήματα αλατότητας εμφανίζονται σε όλες τις κλιματικές συνθήκες και μπορούν να οφείλονται τόσο σε φυσικές όσο και σε ανθρωπογενείς ενέργειες. Συνήθως, τα αλατούχα εδάφη εμφανίζονται σε άγονες και ημίξηρες περιοχές, όπου οι βροχοπτώσεις δεν επαρκούν για να καλύψουν τις απαιτήσεις των καλλιεργειών σε νερό και εκπλένουν ανόργανα άλατα από τη ριζόσφαιρα. Η σχέση μεταξύ ανθρώπου και αλατότητας υφίσταται εδώ και αιώνες, καθώς τα ιστορικά αρχεία δείχνουν ότι πολλοί πολιτισμοί απέτυχαν λόγω της αύξησης της αλατότητας των γεωργικών αγρών, με πιο γνωστό παράδειγμα τη Μεσοποταμία (σημερινό Ιράκ).

Η αλατότητα του εδάφους υπονομεύει τη βάση των πόρων μειώνοντας την ποιότητα του εδάφους και μπορεί να οφείλεται σε φυσικά αίτια ή σε κακή χρήση και διαχείριση, θέτοντας σε κίνδυνο την ακεραιότητα της αυτορρυθμιστικής ικανότητας του εδάφους. Η αλάτωση του εδάφους προβλέπεται να αυξηθεί στα μελλοντικά σενάρια κλιματικής αλλαγής, λόγω της αύξησης της στάθμης της θάλασσας και της αύξησης της θερμοκρασίας, που θα οδηγήσουν σε περαιτέρω αλάτωση. Η αλάτωση των εδαφών μπορεί να επηρεάσει τα οικοσυστήματα σε βαθμό που να μην μπορούν πλέον να λειτουργούν στο πλήρες δυναμικό τους. Υπάρχει ένας μακρύς κατάλογος χωρών στις οποίες παρατηρείται υποβάθμιση του εδάφους λόγω αλάτων.

Η αλατότητα του εδάφους υπάρχει φυσικά στα εδάφη, αλλά αυξάνεται μέσω της ανθρωπογενούς παρέμβασης έμμεσα ή και άμεσα. Φυσιολογικά στις θερμότερες περιοχές και στις ξηρές περιοχές του πλανήτη, εμφανίζεται αυξημένη εδαφική αλατότητα. Για όλα τα σημαντικά καλλιεργήσιμα είδη, η σοδειά έχει μειωθεί κατά 20 – 50 % σε σχέση με τα ιστορικά δεδομένα. Οι απώλειες αυτές έχουν προκληθεί κυρίως εξαιτίας περιβαλλοντικών καταπονήσεων ξηρασίας και αλατότητας, οι οποίες προβλέπεται να γίνουν εντονότερες στα επόμενα χρόνια σε πολλές περιοχές του πλανήτη λόγω της κλιματικής αλλαγής. Η υψηλές θερμοκρασίες και οι αλλαγές στην συχνότητα και την ένταση των βροχοπτώσεων που παρατηρούνται σε όλο τον πλανήτη, αυξάνουν την αλατότητα του εδάφους καθώς αυξάνεται ο ρυθμός με τον οποίο εξατμίζεται το νερό στην επιφάνεια του εδάφους. Με αποτέλεσμα να χρειάζεται περισσότερο νερό για την ύδρευση των καλλιεργειών, να μειώνεται η πρόσληψη θρεπτικών, η βιολογική

αζωτοδέσμευση και να διαταράσσεται ο κύκλος των θρεπτικών (St.Clair and Lynch 2010). Μια μεγάλη γκάμα βιολογικών και τεχνολογικών προσαρμοστικών στρατηγικών είναι απαραίτητο να λάβει χώρα ώστε να αποτραπεί αυτή η καταστροφή. Κατάλληλη διαχείριση των πρώτων υλών, των καλλιεργειών και της κτηνοτροφίας για την εξέλιξη προσαρμοστικότερων πληθυσμών θα μπορούσε να είναι ένα καλό βήμα για την καταπολέμηση της οικολογικής καταστροφής της αλατότητας. Τέτοιες προσεγγίσεις βέβαια είναι εξαιρετικά κοστοβόρες και περίπλοκες, για αυτό το λόγω κρίνεται ιδανικότερο να αναπτυχθούν χαμηλού κόστους βιολογικές μέθοδοι για τον έλεγχο της καταπόνησης αλατότητας. Η χρήση μικροοργανισμών είναι μια αρκετά υποσχόμενη μέθοδος σε αυτό το πλαίσιο, δεδομένου ότι στην φύση μπορούν να βρεθούν μικροοργανισμοί με εξαιρετικές δυνατότητες, τόσο στην ανθεκτικότητα στην καταπόνηση αλατότητας όσο και στην βιοσύνθεση ορμονών που επάγουν την σύνθεση παραγόντων φυτικής ανάπτυξης και επιβίωσης σε δυσμενή περιβάλλοντα. (Shrivastava P 2015)

1.4.2 Αλατότητα και φυτά

Η καταπόνηση αλατότητας αναστέλλει την ανάπτυξη και την ανάπτυξη των φυτών επιβάλλοντας διάφορους σημαντικούς περιορισμούς. Ο πρώτος περιορισμός είναι το οσμωτικό στρες (η μείωση του εξωτερικού δυναμικού νερού) που θέτει σε κίνδυνο την ικανότητα του φυτού να προσλαμβάνει νερό. Η διαδικασία αυτή πυροδοτεί διάφορα σημαντικά γεγονότα στους φυτικούς ιστούς. Σε μακροσκοπικό επίπεδο, η επέκταση τόσο των κυττάρων της ρίζας όσο και των βλαστών αναστέλλεται αμέσως ως αποτέλεσμα της μειωμένης πίεσης σπαργής. Για να αντιμετωπίσουν αυτό το ζήτημα, τα φυτά πρέπει να προσαρμοστούν οσμωτικά. Το μεγαλύτερο μέρος της σπαργής των κυττάρων στη ρίζα ανακτάται εντός 40-60 λεπτών με αύξηση της πρόσληψης ανόργανων ιόντων και η ανάπτυξη συνεχίζεται, αν και με μειωμένο ρυθμό. Το τελευταίο γεγονός εξηγείται πιθανότατα από την τροποποίηση της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος που προκύπτει από τη δέσμευση του Na^+ στα συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος. Το οσμωτικό στρες έχει επίσης ως αποτέλεσμα το γρήγορο κλείσιμο των στομάτων, το οποίο μειώνει την ικανότητα του φυτού να αφομοιώνει CO_2 . Το γρήγορο κλείσιμο των στομάτων μπορεί να εξηγηθεί από την ταχεία πτώση της πίεσης του ξυλώματος (π.χ. κατά 0,05 MPa σε ρίζες αραβοσίτου που εκτίθενται σε 100 mM NaCl) που συνοδεύει το στρες αλατότητας. Αυτή η πτώση της πίεσης του ξυλώματος συμβαίνει μέσα σε λίγα λεπτά από την έναρξη της καταπόνησης, και τα υδραυλικά σήματα που αντιλαμβάνονται οι ρίζες κινούνται με την ταχύτητα του ήχου και μεταδίδονται σχεδόν ακαριαία στον βλαστό, όπου αποκωδικοποιούνται και μεταβάλλουν τον μεταβολισμό του βλαστού. Επειδή τα κύτταρα των φυλάκων των στομάτων διαθέτουν μια σειρά από μηχανικά ευαίσθητους (ενεργοποιούμενους από την τάνυση) διαύλους ιόντων, θα μπορούσαν ενδεχομένως να μεταδώσουν μια μεταβολή της πίεσης του ξυλώματος που προκαλείται από την αλατότητα σε μεταβαλλόμενα ανοίγματα των στομάτων.

Ο δεύτερος περιορισμός που επιβάλλεται από την αλατότητα είναι η ιοντική ανισορροπία (συχνά αποκαλούμενη στη βιβλιογραφία "ιοντικό στρες" ή "ιοντική τοξικότητα"). Στις περισσότερες περιπτώσεις, ο περιορισμός αυτός συνδέεται με υπερβολική συσσώρευση Na^+ και Cl^- σε μεταβολικά ενεργά ενδοκυτταρικά διαμερίσματα. Παραδόξως, η μηχανιστική βάση αυτής της τοξικότητας είναι ελάχιστα κατανοητή. Παρόλο που είναι γνωστό ότι το Na^+ μπορεί να βλάψει τον μεταβολισμό των φυτών και μπορεί δυνητικά να σκοτώσει το φυτό, ο στόχος (οι στόχοι) του Na^+ στο φυτό είναι άγνωστος. Η πιο συνηθισμένη εξήγηση για την τοξικότητα του Na^+ είναι ότι έχει ανασταλτική επίδραση στις δραστηριότητες των ενζύμων. Το κυτταροδιαμέρισμα, για παράδειγμα, περιέχει πολλά ένζυμα που εμπλέκονται στον

πρωτογενή μεταβολισμό, στον κύκλο Calvin, στην οδό των φαινυλοπροπανοειδών, στη γλυκόλυση και στη σύνθεση πολυαμινών και αμύλου. Πολλά από αυτά τα ένζυμα ελέγχονται από το K^+ . Δεδομένης της στενής ομοιότητας μεταξύ του Na^+ και του K^+ , είναι συνήθως αποδεκτό ότι το Na^+ τείνει να αντικαθιστά το K^+ σε αυτές τις ενζυμικές αντιδράσεις, αλλά με πολύ μικρότερη αποτελεσματικότητα. Επιπλέον τα βιομακρομόρια καταλαμβάνουν το 20%-30% του κυτταροπλασματικού όγκου. Επειδή τα βιομακρομόρια είναι πολύπλοκες και φορτισμένες τρισδιάστατες δομές, η λειτουργία τους επηρεάζεται έντονα από τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και την ιοντική ισχύ του διαλύματος, καθώς και από την παρουσία ηλεκτροστατικών δυνάμεων τόσο διαλεγμένων όσο και μη διαλεγμένων.

Ως αποτέλεσμα, τα μικρά ενυδατωμένα ιόντα Na^+ τείνουν να συσσωρεύονται στις περιοχές μεγαλύτερης πυκνότητας, ενώ τα μεγαλύτερα ιόντα K^+ τείνουν να βρίσκονται στις λιγότερο πυκνές περιοχές. Αυτή η διαφορετική ενδοκυτταρική κατανομή ιόντων θα έχει αντίκτυπο στη λειτουργία του κυττάρου, καθώς το σταθερό φορτίο και οι ιοντικές συνθήκες του κυττάρου θα καθορίσουν αναπόφευκτα τις τοπικές σχέσεις νερού που σχετίζονται με τον κυτταροσκελετό και τις πρωτεΐνες.

Ένα συναφές ζήτημα είναι η τοξικότητα των ιόντων χλωρίου (Cl^-). Η τρέχουσα αντίληψη είναι ότι ο αποκλεισμός του Cl^- από τον βλαστό είναι ζωτικής σημασίας για την ανοχή στο αλάτι. Το συμπέρασμα αυτό υποστηρίζεται από τα ευρήματα σε ορισμένα είδη ευαίσθητα στο αλάτι, σύμφωνα με τα οποία τα υψηλά επίπεδα Cl^- στον βλαστό συσχετίζονται θετικά με σοβαρές φυσιολογικές δυσλειτουργίες. Ωστόσο, η αρνητική συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης Cl^- στον βλαστό και της βιομάζας του φυτού που καταγράφηκε για ορισμένα μη αλοφυτικά φυτά που καλλιεργούνται με αλάτι δεν ισχύει για τα αλοφυτικά φυτά, ορισμένα από τα οποία είναι ικανά να συσσωρεύουν Cl^- σε συγκέντρωση $>1 M$ χωρίς να παρουσιάζουν σημαντική αρνητική επίδραση στην απόδοση του φυτού. Οι ερευνητές έχουν υποστηρίξει ότι οι επιβλαβείς επιδράσεις του Cl^- στην απόδοση των φυτών μπορεί να μην είναι αποτέλεσμα τοξικότητας καθεαυτήν, αλλά μάλλον από την προκαλούμενη από το Cl^- ανεπάρκεια βασικών μακροθρεπτικών συστατικών (π.χ. N και S), καθώς η πρόσληψη των NO_3^- και SO_4^{2-} διαμεσολαβείται από τους ίδιους (μη επιλεκτικούς) μεταφορείς ανιόντων όπως το Cl^- . Φαίνεται επομένως ότι η αρνητική επίδραση που προκαλείται είτε από το Na^+ είτε από το Cl^- δεν είναι μια τοξικότητα θρεπτικού συστατικού καθαυτή, αλλά αντίθετα προκύπτει από παρεμβολή στην πρόσληψη ή το μεταβολισμό άλλων βασικών ιόντων. Για το λόγο αυτό, η χρήση του όρου ιοντική ανισορροπία είναι καταλληλότερη και θα πρέπει να χρησιμοποιείται αντί του πιο δημοφιλούς ειδικού όρου ιοντική τοξικότητα (Munns, R. (2005)).

Μια άλλη ευρέως διαδεδομένη παρανόηση σχετίζεται με τη χρονική κλίμακα που επιβάλλουν οι δύο αυτοί περιορισμοί. Η παραδοσιακή άποψη είναι ότι η ιοντική καταπόνηση έχει βραδύτερη ταχύτητα εμφάνισης από την οσμωτική καταπόνηση και λειτουργεί σε κλίμακα ημερών, αν όχι εβδομάδων. Αν και η άποψη αυτή ισχύει για τους ιστούς των βλαστών, δεν ισχύει για το φυτό στο σύνολό του. Σε απόκριση στο ιοντικό στρες, στις ρίζες παρατηρούνται διάφορα γεγονότα PCD (προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος) σε πολύ πιο γρήγορη χρονική κλίμακα. Αποπτωτικά συμβάντα, όπως η απελευθέρωση κυτοχρώματος c, παρατηρούνται στις ρίζες των φυτών εντός ωρών από την έκθεση στην αλατότητα. Στις ρίζες του *Arabidopsis*, το επίπεδο της αυτοφαγίας (μια άλλη μορφή PCD) κορυφώνεται εντός 30 λεπτών από την πίεση αλατιού. Είναι σημαντικό ότι αυτά τα επαγόμενα από την αλατότητα συμβάντα PCD είναι ειδικά για το Na^+ και δεν σχετίζονται με την οσμωτική συνιστώσα της πίεσης αλατιού. Τα επαγόμενα από την αλατότητα γεγονότα PCD στις ρίζες των φυτών μειώνονται σημαντικά ή αποτρέπονται σε μεταλλάξεις του *Arabidopsis* που στερούνται ενός ελεγχόμενου προς τα έξω διορθωτικού διαύλου K^+ (GORK),

υποδηλώνοντας μια αιτιώδη σχέση μεταξύ της εισόδου Na^+ στο κυτταρόλυμα, που οδηγεί σε αποπόλωση της μεμβράνης και συνοδεύεται από εκροή K^+ , και της ενεργοποίησης πρωτεασών και ενδονουκλεασών που μοιάζουν με κασπάση και εκτελούν PCD (Chunzhao Z,2020).

Οι δυσμενείς επιπτώσεις της καταπόνησης αλατότητας (salt stress) εμφανίζονται σχεδόν σε όλα τα φυτά σε ολόκληρο τον φυτικό οργανισμό και σε όλα τα αναπτυξιακά του στάδια. Παρόλα αυτά φαινόμενα ανεκτικότητας ποικίλουν ανάλογα με τα αναπτυξιακά στάδια του εκάστοτε οργανισμού καθώς και από είδος σε είδος. Η καταπόνηση αλατότητας εμφανίζεται ως καταστρεπτικό επεισόδιο (calamitous episode) που είτε επιβάλλεται στα φυτά σποραδικά είτε συνεχόμενα, και στις δυο περιπτώσεις όμως γίνεται σταδιακά εντονότερη η καταπόνηση με το πέρασ του χρόνου. Τα φυτά αντιδρούν στην καταπόνηση με πληθώρα διεργασιών που στοχεύουν στην εξισορρόπηση του κυτταρικού οσμωτικού δυναμικού και την ιοντική ανισορροπία. Η ανθεκτικότητα στην αλατότητα στα φυτά και κατ' επέκταση σταθερότητας παραγωγής είναι κάτι δύσκολο επιτεύξιμο στις καλλιέργειες καθώς εμπεριέχει πολύπλοκα μεταβολικά μονοπάτια που ελέγχονται από πληθώρα παραγόντων.

1.4.3 Αλατότητα και ριζόβια βακτήρια

Όπως αναφέρθηκε η ανάγκη για μια οικολογικότερη και βιώσιμη στροφή στην γεωργία πυροδότησε πληθώρα μελετών σε στελέχη ριζοβίων βακτηρίων όσον αφορά την ποικιλομορφία και την ανθεκτικότητα σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις. Ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα της γεωργίας στις μέρες μας κρίνεται πως είναι η υποβάθμιση της ποιότητας του εδάφους (υπό το πρίσμα της δυνατότητας καλλιέργειας) κυρίως εξαιτίας της αυξημένης συγκέντρωσης αλάτων σε αυτό. Η αυξημένη αλατότητα του εδάφους μειώνει την ανάπτυξη και την βιωσιμότητα των ριζοβίων βακτηριακών πληθυσμών με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται μερικώς – να μειώνεται – η δημιουργία συμβιωτικών σχέσεων μεταξύ ριζοβίων και ψυχανθών, που με την σειρά της μειώνει την ανάπτυξη και την παραγωγή των καλλιεργειών ψυχανθών φυτών. Ενώ παράλληλα « φτωχαίνει» περισσότερο τα εδάφη. (Marta Laranjo 2010). Η συμβίωση μπορεί να επηρεαστεί από την αλατότητα ποικιλοτρόπως. Επηρεάζει δυνητικά την ανάπτυξη και την επιβίωση των ριζοβίων στο έδαφος, στην μόλυνση και τον αποικισμό των ριζοβίων στις ρίζες των ψυχανθών, καθώς και στον σχηματισμό και την λειτουργία των φυματίων. Για αυτό και θεωρείται απαραίτητα να βρεθούν συμβιωτικά μοντέλα (symbiotic patterns) τα οποία μπορούν να πραγματοποιήσουν αζωτοδέσμευση σε συνθήκες καταπόνησης αλατότητας. Σε γενικές γραμμές τα ριζόβια βακτήρια είναι ανεκτικότερα σε καταπόνηση αλατότητας από τα φυτά ξενιστές τους (Munevar and Wollum 1982). Έχει δειχθεί πως η μελέτη της απόκρισης των ριζοβίων σε συγκεντρώσεις NaCl είναι ένας καλός δείκτης για να μελετηθεί η απόκριση των ριζοβίων σε συνθήκες αυξημένης αλατότητας γενικότερα (Abdelmoumen et al. 1999.)

Η αλατότητα είναι από καιρό γνωστό ότι ρυθμίζει αρνητικά τη συμβίωση μεταξύ ριζοβίων και ψυχανθών (Singleton and Bohlool 1984). Παρεμβαίνει στην προκαλούμενη από τα ριζόβια παραμόρφωση των τριχών της ρίζας, εμποδίζει τη μόλυνση από τα ριζόβια και μπλοκάρει την απελευθέρωσή τους από τα νήματα μόλυνσης, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται μόνο λίγα, αναποτελεσματικά φυμάτια με μειωμένη δραστηριότητα της λεγεμοσφαιρίνης και της νιτρογενάσης (Borucki and Sujkowska 2008, Singleton and Bohlool 1984, Tu 1981, Zahran and Sprent 1986). Οι πίνακες ποικιλομορφίας του *Medicago truncatula* και του ρεβιθιού αποκαλύπτουν έντονη ποικιλομορφία όσον αφορά την ανοχή στην αλατότητα, αντανακλώντας τη βαθιά επίδραση που έχει η αλατότητα στην επιτυχία του φυτού και αναδεικνύοντας

γονιδιωματικές περιοχές που μπορεί να έχουν συμβάλει στην τοπική προσαρμογή (Atieno κ.ά. 2017, Cordeiro κ.ά. 2014, Friesen κ.ά. 2014). Οι ριζοβιακοί συμβιωτές από διαφορετικά εδάφη παρουσιάζουν ακόμη μεγαλύτερο εύρος ανοχής στην αλατότητα (Cardoso et al. 2015- Miller-Williams et al. 2006).

Τα ριζοβιακά βακτήρια που είναι ανεκτικά στα άλατα διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην προώθηση της ανάπτυξης των ψυχανθών σε αλατούχες εδαφικές συνθήκες μέσω της ικανότητάς τους να εγκαθιδρύουν συμβιωτική σχέση με τις ρίζες των ψυχανθών και να ενισχύουν την ανοχή του φυτού στα άλατα. Ακολουθεί ο τρόπος με τον οποίο συμβάλλουν στη βελτιωμένη ανάπτυξη των ψυχανθών φυτών σε τέτοιου είδους απαιτητικά περιβάλλοντα:

Δέσμευση αζώτου: Τα ριζοβιακά βακτήρια έχουν τη μοναδική ικανότητα να δεσμεύουν το ατμοσφαιρικό άζωτο σε μορφή που μπορούν να χρησιμοποιήσουν τα ψυχανθή φυτά. Σε αλατούχα εδάφη, η διαθεσιμότητα του ανόργανου αζώτου είναι συχνά περιορισμένη λόγω των δυσμενών επιδράσεων της αλατότητας στην απορρόφηση θρεπτικών συστατικών. Τα ανεκτικά στα άλατα ριζόβια μπορούν να διατηρήσουν τη δραστηριότητά τους για τη δέσμευση του αζώτου υπό αλατούχες συνθήκες, εξασφαλίζοντας σταθερή παροχή αζώτου για τα ψυχανθή. Αυτό είναι ζωτικής σημασίας, διότι το άζωτο αποτελεί θεμελιώδες θρεπτικό συστατικό για την ανάπτυξη των φυτών και την παραγωγή πρωτεϊνών, οι οποίες είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη των φυτών.

Ενισχυμένη πρόσληψη θρεπτικών συστατικών: Τα ανεκτικές στα άλατα ριζόβια μπορούν να βελτιώσουν την αποτελεσματικότητα της πρόσληψης θρεπτικών συστατικών από το φυτό, ακόμη και σε συνθήκες αλατότητας. Σχηματίζοντας κόμβους στις ρίζες του φυτού και εγκαθιδρύοντας συμβιωτική σχέση, τα βακτήρια αυτά ενισχύουν την ικανότητα του φυτού να αποκτά βασικά θρεπτικά συστατικά, συμπεριλαμβανομένου του φωσφόρου, του καλίου και άλλων μικροθρεπτικών συστατικών. Αυτό είναι ζωτικής σημασίας για τη διατήρηση της συνολικής υγείας και ανάπτυξης των φυτών.

Οσμωτική ρύθμιση: Τα ανεκτικά στο στρες αλατότητας ριζόβια βακτήρια μπορούν να συμβάλουν στην οσμωτική προσαρμογή στα φυτά ψυχανθών. Η οσμωτική προσαρμογή είναι η ικανότητα του φυτού να ρυθμίζει το ισοζύγιο νερού και την πίεση σπαραγγής παρουσία υψηλών επιπέδων αλατιού. Βοηθώντας το φυτό να διαχειριστεί την ισορροπία νερού και ιόντων, τα βακτήρια αυτά μειώνουν τον κίνδυνο υδατικής καταπόνησης, η οποία είναι συχνή σε αλατούχα εδάφη.

Μειωμένη συσσώρευση τοξικών ιόντων: Τα ανεκτικά στα άλατα ριζόβια μπορούν να βοηθήσουν στην ελαχιστοποίηση της συσσώρευσης τοξικών ιόντων, όπως το νάτριο, εντός των φυτικών ιστών. Το νάτριο είναι συχνά ο κύριος ένοχος για την καταπόνηση από αλάτι. Τα ριζόβια μπορούν να βοηθήσουν το φυτό να διατηρήσει μια πιο ευνοϊκή ισορροπία των απαραίτητων ιόντων, μειώνοντας τις επιβλαβείς επιπτώσεις του υπερβολικού νατρίου στο μεταβολισμό των φυτών.

Πρωτεΐνες ανοχής στο στρες: Τα βακτήρια αυτά μπορούν επίσης να διεγείρουν την παραγωγή πρωτεϊνών ανοχής στο στρες στα ψυχανθή φυτά. Αυτές οι πρωτεΐνες βοηθούν το φυτό να αντιμετωπίσει τις δυσμενείς επιπτώσεις του αλατούχου στρες, προστατεύοντας τις κυτταρικές δομές και τα ένζυμα από βλάβες.

Βελτιωμένη δομή των ριζών: Τα ριζόβια βακτήρια που επάγουν τον σχηματισμό φυματίων στις ρίζες του φυτού, τα οποία χρησιμεύουν ως χώροι για τη δέσμευση του αζώτου. Αυτές οι δομές μπορούν επίσης να βελτιώσουν τη δομή των ριζών, οδηγώντας σε αυξημένη διακλάδωση και επιμήκυνση των ριζών. Αυτό το

διευρυμένο ριζικό σύστημα επιτρέπει στο φυτό να εξερευνήσει μεγαλύτερο όγκο εδάφους για νερό και θρεπτικά συστατικά, γεγονός ιδιαίτερα πολύτιμο σε αλατούχα εδάφη όπου οι πόροι είναι περιορισμένοι.

Αποκλεισμός αλατότητας: Σε ορισμένες περιπτώσεις, τα ανεκτικά στο αλάτι βακτηριοειδή μπορούν να βοηθήσουν στον αποκλεισμό του υπερβολικού αλατιού από την είσοδο στις ρίζες του φυτού, που αποτελεί μηχανισμό προστασίας του φυτού από την τοξικότητα του αλατιού.

Καθιερώνοντας μια αμοιβαία επωφελή σχέση με τα ψυχανθή φυτά και συμβάλλοντας στη δέσμευση αζώτου, στη βελτιωμένη πρόσληψη θρεπτικών στοιχείων και στην ανοχή στα άλατα, τα ανεκτικά στα άλατα ριζοβιακά βακτήρια αποτελούν κρίσιμους εταίρους που επιτρέπουν στα ψυχανθή φυτά να ευδοκιμήσουν σε συνθήκες αλατούχου εδάφους. Αυτή η συνέργεια μεταξύ φυτών και βακτηρίων αποτελεί παράδειγμα της αξιοσημείωτης προσαρμοστικότητας της φύσης σε δύσκολα περιβάλλοντα.

Η επιλογή και ο χαρακτηρισμός ανθεκτικών στην αλατότητα ριζοβίων βακτηρίων που μπορούν να αζωτοδεσμεύουν επαρκώς σε συνθήκες καταπόνησης είναι δυνητικά μια καλή στρατηγική για να βελτιωθεί η καλλιέργεια ψυχανθών υπό καταπόνηση με λιγότερη ανθρώπινη χημική ή μηχανική παρέμβαση. Φτάνοντας έτσι σε ένα μοντέλο καλλιέργειας οικονομικά και οικολογικά βιώσιμο. Μέσα σε αυτό πλαίσιο ως στόχος της παρούσας πτυχιακής εργασίας τέθηκε η απομόνωση και ο μοριακός χαρακτηρισμός συμβιωτικών βακτηρίων για την ακακία, όπως επίσης και αδρή μελέτη της ανθεκτικότητας των ριζοβίων που απομονώθηκαν στην αλατότητα (Flowers et al 2010, Munns, R., & Tester, M. (2008)).

1.4.4 Επίδραση καταπόνησης αλατότητας στα ψυχανθή φυτά

Όταν τα ψυχανθή φυτά βρίσκονται σε εδάφη με υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων, αντιμετωπίζουν διάφορες προκλήσεις που απειλούν την επιβίωση και την παραγωγικότητά τους. Το αλατούχο στρες διαταράσσει την κυτταρική ομοιόσταση των ιόντων αυξάνοντας την εισροή ιόντων νατρίου (Na^+) και μειώνοντας την πρόσληψη βασικών θρεπτικών συστατικών όπως το κάλιο (K^+). Αυτή η ανισορροπία στις συγκεντρώσεις ιόντων μπορεί να διαταράξει τις κυτταρικές διεργασίες, να παρεμποδίσει τη δράση των ενζύμων και τις μεταβολικές διεργασίες που είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη και την επιβίωση των φυτών.

Για να εξουδετερώσουν αυτές τις επιπτώσεις, τα ψυχανθή φυτά με φυμάτια αναπτύσσουν εξελιγμένες στρατηγικές σε κυτταρικό επίπεδο. Οι αντλίες ιόντων και οι μεταφορείς, συμπεριλαμβανομένων των αντλιών Na^+/H^+ της πλασματικής μεμβράνης και των μεταφορέων K^+ , ρυθμίζονται ώστε να ελαχιστοποιείται η πρόσληψη τοξικών ιόντων νατρίου, διατηρώντας παράλληλα επαρκή επίπεδα καλίου εντός των κυττάρων. Επιπλέον, μηχανισμοί αποκλεισμού νατρίου, όπως η σύνθεση οργανικών οξέων και ο διαμερισμός των ιόντων νατρίου, συμβάλλουν στην πρόληψη της τοξικότητας του νατρίου και στη διατήρηση της κυτταρικής οσμωτικής ισορροπίας. (Yang et al 2008)

Το ωσμωτικό στρες, που προκύπτει από τις υψηλές συγκεντρώσεις αλατιού, αποτελεί άλλη μια πρόκληση για τα φυτικά κύτταρα, καθώς διαταράσσει την πρόσληψη νερού και οδηγεί σε αφυδάτωση. Σε απάντηση, τα φυτά ψυχανθών συσσωρεύουν συμβατές διαλυτές ουσίες, όπως προλίνη, γλυκίνη-βηταΐνη και σάκχαρα, για να διατηρήσουν την κυτταρική πίεση σπαργής και να αποτρέψουν την απώλεια νερού. Η βιοσύνθεση αυτών των οσμοπροστατευτικών ουσιών ρυθμίζεται από γονίδια και μονοπάτια που ανταποκρίνονται στο στρες, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που αφορούν το αμισικό οξύ (ABA) και τους μεταγραφικούς παράγοντες του οσμωτικού στρες.

Επιπλέον, το αλατούχο στρες προκαλεί με τη σειρά του και οξειδωτικό στρες στα φυτικά κύτταρα με τη δημιουργία δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS), συμπεριλαμβανομένων των ριζών υπεροξειδίου (O_2^{--}), του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) και των ριζών υδροξυλίου (-OH). Οι ROS μπορούν να βλάψουν κυτταρικά συστατικά όπως πρωτεΐνες, λιπίδια και DNA, οδηγώντας σε οξειδωτική καταπόνηση και κυτταρικό θάνατο. Για την αντιμετώπιση της συσσώρευσης ROS, τα ψυχανθή φυτά ενεργοποιούν αντιοξειδωτικούς αμυντικούς μηχανισμούς.

Βασικά αντιοξειδωτικά ένζυμα, όπως η δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD), η καταλάση (CAT), οι υπεροξειδάσες (POX) και τα ένζυμα που εμπλέκονται στον κύκλο ασκορβίτη-γλουταθειόνης, ρυθμίζονται για την αποτοξίνωση των ROS και τη διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης της οξειδοαναγωγής. Η έκφραση των αντιοξειδωτικών γονιδίων ρυθμίζεται από μεταγραφικούς παράγοντες που ανταποκρίνονται στο στρες, συμπεριλαμβανομένων των μελών των οικογενειών AP2/ERF, MYB και WRKY, οι οποίοι προσδένονται σε συγκεκριμένα cis-ρυθμιστικά στοιχεία στις περιοχές υποκινητών των γονιδίων-στόχων. (Geilfus 2015)

Εκτός από την αντιμετώπιση της καταπόνησης από το αλάτι σε κυτταρικό επίπεδο, τα ψυχανθή φυτά με φυμάτια πρέπει επίσης να διατηρούν την ακεραιότητα και τη λειτουργικότητα των συμβιωτικών φυματίων τους, όπου λαμβάνει χώρα η δέσμευση του αζώτου. Η καταπόνηση από το αλάτι μπορεί να βλάψει το φυμάτιο και να μειώσει τη δραστηριότητα αζωτοδέσμευσης, περιορίζοντας τη διαθεσιμότητα του αζώτου για την ανάπτυξη των φυτών. Για να διατηρήσουν τη συμβιωτική δέσμευση του αζώτου σε συνθήκες αλατούχου στρες, τα ψυχανθή φυτά και τα ριζοβιακά βακτήρια χρησιμοποιούν διάφορους προσαρμοστικούς μηχανισμούς.

Το φυτό παράγει σηματοδοτικά μόρια, όπως φλαβονοειδή και παράγοντες δημιουργίας φυματίων (NFs), τα οποία προάγουν την εγκαθίδρυση συμβίωσης και την ανάπτυξη των φυματίων ακόμη και σε συνθήκες αλατότητας. Τα ριζόβια βακτήρια με τη σειρά τους, προσαρμόζουν το μεταβολισμό και τη φυσιολογία τους για να ανέχονται το αλατούχο στρες, συμπεριλαμβανομένης της σύνθεσης ωσμοπροστατευτικών ουσιών και της έκφρασης γονιδίων που ανταποκρίνονται στο στρες. Η επικοινωνία μεταξύ φυτών και ριζοβίων διαμεσολαβείται από ένα πολύπλοκο δίκτυο σηματοδοτικών μονοπατιών, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που περιλαμβάνουν κινάσες υποδοχέων φυματιωγένεσης (nodulation receptor kinases (NORKs)) και κινάσες συμβίωσης που ομοιάζουν με υποδοχείς (symbiosis receptor-like kinases (SYMRKs)).

Συνολικά, η απόκριση των ψυχανθών φυτών στην καταπόνηση από αλάτι ενορχηστρώνεται από μια πολύπλοκη αλληλεπίδραση μοριακών, φυσιολογικών και βιοχημικών διεργασιών. Ρυθμίζοντας την ομοιόσταση των ιόντων, την οσμωτική ισορροπία, την αντιοξειδωτική άμυνα και τις συμβιωτικές αλληλεπιδράσεις, τα φυτά αυτά μπορούν να μετριάσουν τις βλαβερές συνέπειες της καταπόνησης από αλάτι και να διατηρήσουν την ανάπτυξη και την παραγωγικότητα ακόμη και σε δύσκολα περιβάλλοντα. (Bouzroud, S., 2023)

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Θρεπτικά Μέσα

Τα θρεπτικά μέσα Yeast Mannitol Broth & Yeast Mannitol Agar χρησιμοποιούνται για την καλλιέργεια διαφόρων ειδών του γένους *Rhizobium*.

Το εκχύλισμα ζύμης (yeast extract) αποτελεί πολύτιμη πηγή άμεσα διαθέσιμων αμινοξέων, συμπλέγματος βιταμινών Β και βοηθητικών αυξητικών παραγόντων για τα ριζόβια. Επίσης, ρυθμίζει την οξείδωση του μέσου σε ευνοϊκό εύρος για τα ριζόβια και χρησιμεύει ως δότης υδρογόνων κατά την αναπνευστική διαδικασία. Η μαννιτόλη (mannitol) αποτελεί την πηγή σακχάρου και άρα ενέργειας. Το μαγνήσιο (magnesium) παρέχει κατιόντα ουσιώδη για την ανάπτυξη των ριζοβίων

Ανάπτυξη βακτηριακών καλλιεργειών σε υγρό θρεπτικό μέσο **Yeast Mannitol Broth (YMB)** – υγρές καλλιέργειες.

Για τις καλλιέργειες/εμβολιασμούς των διαφόρων ριζοβίων αγνώστου ταυτότητας (μη ταυτοποιημένα είδη) έγινε χρήση του υγρού θρεπτικού μέσου Yeast Mannitol Broth (YMB), η σύνθεση του οποίου απεικονίζεται στον Πίνακα 2.1.

Πίνακας 2.1: Η σύνθεση του υγρού θρεπτικού υποστρώματος YMB	
ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	gr/L
Μανιτόλη (Mannitol)	10.000
K ₂ HPO ₄ (Dipotassium phosphate)	0.500
MgSO ₄ ·7H ₂ O (Magnesium sulphate)	0.200
NaCl (Sodium chloride)	0.100
Εκχύλισμα ζύμης (Yeast extract)	0.500

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ:

1. Μέτρηση ποσοτήτων συστατικών σε ζυγό ακριβείας.
2. Προσθήκη συστατικών σε απεσταγμένο νερό (distilled water).
3. Ανάδευση
4. Αποστείρωση θρεπτικού υλικού σε κλίβανο αποστείρωσης (autoclave) σε πίεση 15 lbs στους 121°C για 20 min.
5. Θρεπτικό μέσο έτοιμο για εμβολιασμό σε υγρή καλλιέργεια (liquid culture).

Μετά τον εμβολιασμό σε δοχεία τύπου falcon round-bottom polystyrene tubes σε 3 ml YMB, ακολουθεί επώαση σε ειδικό shaker στους 28°C, με συνεχή ανακίνηση, για overnight ανάπτυξη.

Ανάπτυξη βακτηριακών καλλιιεργειών σε στερεό θρεπτικό μέσο **Yeast Mannitol Agar (YMA)** – στερεές καλλιέργειες.

Για τις καλλιέργειες/εμβολιασμούς των διαφόρων ριζοβίων αγνώστου ταυτότητας (μη ταυτοποιημένα είδη) έγινε χρήση του στερεού θρεπτικού μέσου Yeast Mannitol Agar (YMA) καθώς και χρήση του ίδιου μέσου με προσθήκη χρωστικής Congo Red (YMA + CR), η σύνθεση του οποίου απεικονίζεται στον Πίνακα 2.2.

Πίνακας 2.2: Η σύνθεση του στερεού θρεπτικού υποστρώματος YMA + CR	
ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	gr/L
Μανιτόλη (Mannitol)	10.000
K ₂ HPO ₄ (Dipotassium phosphate)	0.500
MgSO ₄ -7H ₂ O (Magnesium sulphate)	0.200
NaCl (Sodium chloride)	0.100
Εκχύλισμα ζύμης (Yeast extract)	0.500
Άγαρ (Agar)	15.000
Χρωστική Congo Red	0.025

Τελικό pH (25°C) 6,8 ±0,2

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1. Μέτρηση ποσοτήτων συστατικών σε ζυγό ακριβείας.
2. Προσθήκη συστατικών σε 1 L απεσταγμένο νερό (distilled water).
3. Θέρμανση και ανάδευση, ώστε να διαλυτοποιηθούν επαρκώς.
4. Αποστείρωση θρεπτικού υλικού σε κλίβανο αποστείρωσης (autoclave) σε πίεση 15 lbs στους 121°C για 20 min.
5. Ανάδευση και τοποθέτηση σε αποστειρωμένα τρυβλία Petri υπό ασηπτικές συνθήκες.
6. Στέγνωμα τρυβλίων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
7. Αναποδογύρισμα τρυβλίων για αποφυγή υγρασίας, τύλιγμα με ζελατίνη και φύλαξη στους 4°C.
8. Τρυβλία έτοιμα για εμβολιασμό (streaking).

Σημείωση: Μετά τον εμβολιασμό των τρυβλίων από υγρές YMB βακτηριακές καλλιέργειες, ακολουθεί επώαση σε ειδικό θάλαμο επώασης στους 25-30°C για 2-5 ημέρες. Η ταχύτητα εμφάνισης των βακτηριακών αποικιών εξαρτάται από το είδος του εκάστοτε βακτηρίου, εάν είναι δηλαδή ταχείας ή βραδείας ανάπτυξης.

2.2 Δοκιμή ανεκτικότητας στην αλατότητα

Για την δοκιμή ανεκτικότητας των ριζοβίων σε επίπεδα αλατότητας, χρησιμοποιήθηκαν στερεές και υγρές καλλιέργειες με θρεπτικό μέσω YMA και YMB αντίστοιχα, με διαβαθμισμένες συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου (NaCl).

Πιο συγκεκριμένα για τις δοκιμές σε στερεή καλλιέργεια χρησιμοποιήθηκαν τετράγωνα τρυβλία τα οποία και χωρίστηκαν σύμφωνα με το ακόλουθο πρότυπο (Πίνακας 2.2.2)

Πίνακας 2.2.2 Διάταξη τετράγωνου τρυβλίου δοκιμής ανεκτικότητας

	Strain #1	Strain #2	Strain #3	Strain #4	Strain #5	Strain #6	Strain #7	Strain #8	
10^{-2}									10^{-2}
10^{-3}									10^{-3}
10^{-4}									10^{-4}
10^{-5}									10^{-5}
10^{-5}									10^{-5}
10^{-4}									10^{-4}
10^{-3}									10^{-3}
10^{-2}									10^{-2}
	Strain #1	Strain #2	Strain #3	Strain #4	Strain #5	Strain #6	Strain #7	Strain #8	

Σε κάθε τεταρτημόριο μελετήθηκαν στελέχη που είχαν προηγουμένως απομονωθεί από το ίδιο φυμάτιο του ίδιου φυτού. Είχαν προηγηθεί υγρές καλλιέργειες 3 mL YMB control. Και επώασή τους μέχρις ότου η οπτική απορρόφηση των δειγμάτων να φτάσει τα 0.3 στα 600 nm από όπου και πραγματοποιήθηκαν δεκαδικές αραιώσεις του κάθε στελέχους σε Eppendorf μέχρι τελική αραιώση 10^{-5} . Ύστερα πάρθηκαν 7μl από την εκάστοτε αραιώση του κάθε βακτηριακού στελέχους και εμβολιάστηκαν στο τρυβλίο σύμφωνα με τις συγκεντρώσεις των καλλιεργειών με δεκαδικές αραιώσεις. Ξεκινώντας από το πυκνό 10^{-2} και φτάνοντας μέχρι την αραιώση 10^{-5} . Χρησιμοποιήθηκαν τρυβλία με συγκέντρωση NaCl: control (0.0017 M) , 0.2 % NaCl , 0.5 % NaCl , 0.75% NaCl και 1% NaCl. Τα τρυβλία επώαστηκαν στους 27 °C για τρεις ημέρες (72 hr) ύστερα πάρθηκαν φωτογραφίες.

Ακολούθως επιλέχθηκαν 8 βακτηριακά στελέχη από το σύνολο που μελετήθηκαν με την διαδικασία της στερεής καλλιέργειας με διαβαθμισμένα επίπεδα αλατότητας. Πιο συγκεκριμένα επιλέχθηκαν έξι

ανθεκτικά σε υψηλές αλατότητες στελέχη τα YP 1.2.2 , YP 1.3.1, YP 2.2.2, YP 4.1.2, YP 5.3.3 και YP 5.4.3, και δύο ευαίσθητα στο στρες αλατότητας στελέχη YP 3.6.4 και HAMBI.

Ακολούθησε υγρή καλλιέργεια αυτών των 8 στελεχών σε YMB και μέτρηση της οπτικής απορρόφησης τους ανά 24 ώρες, μέχρις ότου η απορρόφηση στα 600 nm να είναι στα 0.2. Παρατηρήθηκε πως δεν είχαν όλα τα στελέχη τον ίδιο ρυθμό ανάπτυξης, πράγμα που επιβεβαιώνεται και από τις στερεές καλλιέργειές τους. Έτσι χρειάστηκε να αραιωθούν ορισμένα για να έχουν όλα την ζητούμενη απορρόφηση. Μόλις επιτεύχθηκε αυτό τα στελέχη καλλιεργήθηκαν σε 2 mL YMB με διαβαθμισμένες συγκεντρώσεις NaCl (control , 0.2%, 0.5%, 0.75%, 1%, 2%). Από αυτά μετρήθηκαν οι οπτικές απορροφήσεις στα 600 nm ανά 48 ώρες και πραγματοποιήθηκαν καμπύλες ανάπτυξης.

2.3 Ενίσχυση γονιδιακών τμημάτων με χρήση Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης – Polymerase Chain Reaction, PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι μια μέθοδος βιοχημείας και μοριακής βιολογίας για την απομόνωση και τον πολλαπλασιασμό μιας αλληλουχίας DNA. Μια συγκεκριμένη περιοχή του γονιδιώματος με την χρήση της PCR δύναται να πολλαπλασιαστεί μέχρι και δεκατομμύρια φορές. Μοναδική προϋπόθεση για να μπορεί να εφαρμοστεί η PCR είναι η επιθυμητή περιοχή DNA να έχει γνωστή νουκλεοτιδική αλληλουχία. Ούτως ώστε να μπορούν να σχεδιαστούν κατάλληλοι ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές (primers). Οι primers πρέπει να δεσμεύονται σε αντίθετες θέσεις μεταξύ τους επάνω στην αλληλουχία που πρόκειται να ενισχυθεί. Δηλαδή να δεσμεύονται σε αντιδιαμετρικές θέσεις στον επιθυμητό τμήμα. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης περιλαμβάνει επαναλαμβανόμενες αλλαγές συνθηκών θερμοκρασίας (κύκλοι) και κάθε κύκλος της PCR αποτελείται από τα ακόλουθα βήματα. Αρχικά συμβαίνει διαχωρισμός της διπλής έλικας του δείγματος DNA σε δύο μονές αλυσίδες DNA διαδικασία που ονομάζεται αποδιάταξη DNA (DNA denaturation), ακολουθεί ο υβριδισμός (annealing) μητρικού δείγματος DNA (template) – εκκινητών (primers) και τέλος πραγματοποιείται η επιμήκυνση (elongation) του υβριδίου με την δράση της DNA πολυμεράσης που χρησιμοποιήθηκε.

Σε μία συνήθη – κοινή αντίδραση PCR περιλαμβάνονται τα ακόλουθα:

- DNA
- Εκκινητές (Forward, Reverse)
- dNTPs
- Ρυθμιστικό Διάλυμα (+Μαγνήσιο)
- Taq πολυμεράση
- ddH₂O

Η Taq πολυμεράση αρχικά απομονώθηκε από το θερμοφίλο βακτήριο *Thermus aquaticus*. Είναι μια θερμοσταθερή DNA πολυμεράση που χρησιμοποιείται συχνά στην PCR.

Στην συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκε το μίγμα «2 × MyTaq™ Red Mix» (Bioline,USA)

Πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για τα πυρηνικά γονίδια *atpD*, *recA*, *gnlII* καθώς και για το πλασμοδιακά *nifH* και *nodA* γονίδια όπως και την αλληλουχία 16S rRNA των 8 επιλεγμένων στελεχών (YP 1.2.2 , YP 1.3.1, YP 2.2.2, YP 4.1.2, YP 5.3.3 YP 5.4.3, YP 3.6.4 και HAMBI.). Οι εκκινητές (primers) που επιλέχθηκαν ήταν οι και οι συνθήκες PCR που ακολουθήθηκαν ήταν οι ακόλουθες:

- 16S rRNA
 - Forward: fD1 με αλληλουχία (5' → 3') AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
 - Reverse: rD1 με αλληλουχία (5' → 3') AAGGAGGTGATCCAGCC

Θερμοκρασία 95°C για 5 λεπτά, 35 κύκλοι στους 95°C για 45 δευτερόλεπτα, στους 60°C για 1 λεπτό, στους 72°C για 2 λεπτά και στους 72°C για 10 λεπτά. (Weisburg et al, 1991)
- nifH
 - Forward: nifH PolF με αλληλουχία (5' → 3') TGCGAYCCSAARGCBGACTC
 - Reverse: nifH PolR με αλληλουχία (5' → 3') ATSGCCATCATYTCRCCGGA

Θερμοκρασία 95°C για 5 λεπτά, 35 κύκλοι στους 95°C για 45 δευτερόλεπτα, στους 62°C για 45 δευτερόλεπτα, στους 72°C για 1 λεπτό και στους 72°C για 2 λεπτά. (Poly et al., 2001)
- nodA
 - Forward: nodA-1 με αλληλουχία (5' → 3') TGCRGTGGAARNTRNNCTGGGAAA
 - Reverse: nodA2 με αλληλουχία (5' → 3') GGNCCGTCRTRAAWGTCARGTA

Θερμοκρασία 95°C για 5 λεπτά, 35 κύκλοι στους 95°C για 45 δευτερόλεπτα, στους 56°C για 45 δευτερόλεπτα, στους 72°C για 1 λεπτό και στους 72°C για 2 λεπτά. (Haukka et al., 1998)
- atpD
 - Forward: atpDF με αλληλουχία (5' → 3') ATCG GCGAGCCGGTTCGACGA
 - Reverse: atpDR με αλληλουχία (5' → 3') GCCG ACACTTCCGAACCNGCCTG

Θερμοκρασία 95°C για 5 λεπτά, 35 κύκλοι στους 95°C για 45 δευτερόλεπτα, στους 62°C για 45 δευτερόλεπτα, στους 72°C για 1 λεπτό και στους 72°C για 2 λεπτά. (M.W. Gaunt et al., 2001)
- recA
 - Forward: recA1 με αλληλουχία (5' → 3') CATGCRCTGGATCCGGTCTATGC
 - Reverse: recA2 με αλληλουχία (5' → 3') CTGTGTTCTGTGCGACCTTGACGCG

Θερμοκρασία 95°C για 5 λεπτά, 35 κύκλοι στους 95°C για 45 δευτερόλεπτα, στους 62°C για 45 δευτερόλεπτα, στους 72°C για 1 λεπτό και στους 72°C για 2 λεπτά. (X. Perret and W.J. Broughton, 1998)
- glnII
 - Forward: glnII 12F με αλληλουχία (5' → 3') YAAGCTCGAGTACATYTTGGCT
 - Reverse: glnII 689R με αλληλουχία (5' → 3') TGCATGCCSGAGCCGTTCCA

Θερμοκρασία 95°C για 5 λεπτά, 35 κύκλοι στους 95°C για 45 δευτερόλεπτα, στους 58°C για 45 δευτερόλεπτα, στους 72°C για 1 λεπτό και στους 72°C για 2 λεπτά. (P. Vinuesa et al, 2005)

2.4 Ηλεκτροφόρηση

Για την οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων της PCR χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της ηλεκτροφόρισης σε πηκτή αгарόζης. Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης αποτελεί μία σημαντική αναλυτική μέθοδο για τον διαχωρισμό ιονισμένων μακρομορίων, DNA στην προκειμένη περίπτωση. Η τεχνική βασίζεται στην κίνηση φορτισμένων σωματιδίων σε υγρό μέσο υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Το δίκλωνο DNA είναι

αρνητικά φορτισμένο και κινείται από τον αρνητικό προς το θετικό πόλο. Πραγματοποιείται χρώση των προς μελέτη μακρομορίων με βρωμιούχο αιθίδιο. Η αναγνώριση των τμημάτων DNA γίνεται μέσω συσκευής εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας. Η πηκτή είχε πυκνότητα 1.2% αγαρόζη για τα 16s γονίδια ενώ 3% για τα rnfH, η πυκνότητα μπορεί να διαφέρει ανάλογα με το είδος του δείγματος που μελετάται. Επίσης χρησιμοποιούνται μείγματα μακρομορίων με συγκεκριμένο μέγεθος σαν «ελεγκτές» (ladders) οι οποίοι «φορτώνονται» και αυτοί στην πηκτή όπως και τα προς μελέτη δείγματα. Η διαδικασία κατασκευής της πηκτής είναι η ακόλουθη:

Τοποθετούνται σε θερμασμένο διάλυμα Tris-acetate-EDTA (TAE buffer), 1.2 % και 3% αγαρόζη αντίστοιχα και βρωμιούχο αιθίδιο. Ακολουθεί ανάδευση. Έπειτα τοποθετείται το διάλυμα στην συσκευή ηλεκτροφόρησης, επιλέγονται τα κατάλληλα καλούπια για τα πηγάδια (wells) που θα «φορτωθούν» τα δείγματα και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για να πήξει το διάλυμα.

Τέλος «φορτώνονται» τα δείγματα – αποτελέσματα της PCR – συνδέονται τα ηλεκτρόδια και τα δείγματα «τρέχουν» (κινούνται λόγω της επίδρασης του ηλεκτρικού πεδίου) για διάστημα 30 λεπτών στα 90V (οι συνθήκες ποικίλουν ανάλογα τα μελετούμενα μόρια). Έπειτα μεταφέρεται η πηκτή αγαρόζης στη συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας όπου και φαίνεται το οπτικό αποτέλεσμα μέσω ειδικής κάμερας.

2.5 Φυλογενετικά δέντρα

Η φυλογενετική είναι κομμάτι της συστηματικής βιολογίας που μελετά την εξελικτική ιστορία και τους συσχετισμούς μεταξύ οργανισμών. Αυτοί οι συσχετισμοί είναι υποθετικοί και πλέον χρησιμοποιούνται αλγόριθμοι – μοντέλα που βασίζονται σε συγκριτική μελέτη οργανισμών με βάση την αλληλουχία DNA τους ή των αμινοξικών τους αλληλουχιών. Η συνήθης απεικόνιση των αποτελεσμάτων των αλγορίθμων γίνεται με χρήση φυλογενετικών δέντρων. Τα φυλογενετικά δέντρα αποτελούν μια διαγραμματική υπόθεση των συσχετισμών μιας ομάδας οργανισμών.

Από την ανάλυση των δένδρων μπορούμε να λάβουμε πληροφορίες για την ταξινόμηση των μελετώμενων οργανισμών καθώς και τις εξελικτικές τους σχέσεις. Η φυλογενετική ανάλυση απομακρυσμένων οργανισμών όπως τα βακτήρια, χρειάζεται ένα μόριο το οποίο να είναι παρόν σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς. Για το λόγο αυτό, συνιστάται το ριβοσωμικό RNA (rRNA) το οποίο παρουσιάζει ένα χαμηλό βαθμό ανεκτικότητας στις μεταλλάξεις και εξελίσσεται με πολύ αργό ρυθμό (Κοσσίδα Σ., 2008). Ένας κλάδος (clade) περιλαμβάνει έναν κόμβο και όλες τις ταξινομικές μονάδες (taxa) που προκύπτουν από αυτόν, ενώ κόμβος (node) ονομάζεται το σημείο όπου ενώνονται οι βραχίονες. Στο δένδρο η ρίζα αντικατοπτρίζει τον πιο κοντινό πρόγονο από τον οποίο προήλθαν οι υπό εξέταση ταξινομικές μονάδες (taxa) (Κοσσίδα Σ., 2008).

Η ανάλυση αλληλουχίας πολλαπλών θέσεων (MLSA) είναι μια εξελιγμένη μοριακή μέθοδος που χρησιμοποιείται στον τομέα της φυλογενετικής ανάλυσης, ιδίως στη μελέτη βακτηρίων και άλλων μικροοργανισμών. Περιλαμβάνει την αλληλούχιση πολλαπλών συντηρημένων γονιδίων, ή τόπων, από τα γονιδιώματα των οργανισμών-στόχων και την επακόλουθη σύγκριση αυτών των αλληλουχιών για την οριοθέτηση των εξελικτικών σχέσεων. Η MLSA είναι ένα πολύτιμο εργαλείο για την κατανόηση της γενετικής ποικιλομορφίας, της ταξινομίας και της εξελικτικής ιστορίας των βακτηριακών ειδών.

Στη βακτηριακή MLSA, επιλέγονται συνήθως για ανάλυση συγκεκριμένα γονίδια-οικοδεσπότες που εξελίσσονται με σχετικά σταθερό ρυθμό και είναι καθολικά παρόντα στο είδος-στόχο. Παραδείγματα τέτοιων γονιδίων συχνά περιλαμβάνουν τμήματα του γονιδίου 16S rRNA, καθώς και γονίδια που σχετίζονται με βασικές μεταβολικές λειτουργίες. Οι συνυφασμένες αλληλουχίες αυτών των τόπων δημιουργούν ένα ιδιαίτερα κατατοπιστικό σύνολο δεδομένων που προσφέρει υψηλότερη ανάλυση σε σύγκριση με τις αναλύσεις μεμονωμένων γονιδίων, επιτρέποντας στους ερευνητές να διακρίνουν λεπτές γενετικές παραλλαγές μεταξύ στενά συγγενών βακτηριακών στελεχών ή ειδών.

Για παράδειγμα, η MLSA έχει συμβάλει στην αποσαφήνιση των ταξινομικών ασάφειας μεταξύ των βακτηρίων. Έχει εφαρμοστεί για την επίλυση περίπλοκων σχέσεων σε γένη όπως το *Escherichia*, το *Streptococcus* και το *Vibrio*, όπου οι παραδοσιακές μέθοδοι από μόνες τους μπορεί να μην παρέχουν την απαραίτητη διακριτική ικανότητα. Με την εξέταση πολλαπλών τόπων, η MLSA μπορεί να προσφέρει μια πιο ακριβή απεικόνιση της εξελικτικής ιστορίας και της συγγένειας μεταξύ βακτηριακών στελεχών, ενισχύοντας την κατανόηση της μικροβιακής ποικιλότητας και εξέλιξης. Η προσέγγιση αυτή είναι ιδιαίτερα πολύτιμη όταν πρόκειται για ταχέως εξελισσόμενες ή εξαιρετικά ποικιλόμορφες μικροβιακές ομάδες, όπου οι αναλύσεις ενός γονιδίου μπορεί να μην αποτυπώνουν την πλήρη έκταση της γενετικής ποικιλότητας.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν μοτίβα που προέκυψαν από την αλληλούχιση των προηγούμενων ενισχυμένων από την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης τμημάτων 16S και *nifH*. Η αλληλούχιση δεν πραγματοποιήθηκε στην συγκεκριμένη πειραματική πορεία – στα πλαίσια της διπλωματικής εργασίας, αλλά στάλθηκαν τα αποτελέσματα της PCR σε εργαστήριο και αλληλουχήθηκαν εκεί. Πάρθηκαν έπειτα τα αποτελέσματα της αλληλούχισης και με χρήση δύο προγραμμάτων δομήθηκαν τα φυλλογενετικά δένδρα.

Αρχικά χρησιμοποιήθηκε το DNABaser (DNA Sequence Assembler v4 (2013), Heracle BioSoft, www.DnaBaser.com) για την επεξεργασία και καθαρισμό από θόρυβο των αποτελεσμάτων της αλληλούχισης. Έπειτα έγινε χρήση του MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms (Kumar, Stecher, Li, Knyaz, and Tamura 2018) για την δημιουργία των φυλλογενετικών δένδρων. Στο εν λόγω πρόγραμμα χρησιμοποιήθηκαν οι αλγόριθμοι Neighbor-Joining και Maximum Likelihood για τα 16S και τα *nifH* γονίδια για την κατασκευή του δένδρου με bootstrap 1000 επαναλήψεων. Τα δένδρα είναι σχεδιασμένα σε κλίμακα. Επιλέχθηκε σαν προτιμότερος αλγόριθμος ο Neighbor-Joining (NJ). Η εξελικτικές αποστάσεις υπολογίστηκαν με την χρήση της μεθόδου Maximum Composite Likelihood method για τα 16S γονίδια ενώ για τα *nifH* γονίδια έγινε χρήση της μεθόδου Kimura 2. Επιλέχθηκαν στελέχη για τον έλεγχο των βιολογικών συσχετισμών των 8 προς μελέτη στελεχών με χρήση του nucleotide Blast (www.ncbi.com) με βάση

2.6 Μολυνση σπόρων DB και SD με τα ριζόβια βακτήρια

2.6.1 Το φυτό

Επιλέχθηκαν δύο διαφορετικοί οικότυποι ροβίνιας με τις ονομασίες DB και SD.

2.6.2 Επιφανειακή αποστείρωση και τραυματισμός σπόρων

Οι σπόροι αποστειρώθηκαν επιφανειακά ούτως ώστε να βεβαιωθεί πως δεν θα φέρουν μη επιθυμητούς για το συγκεκριμένο πείραμα μικροοργανισμούς. Ενώ παράλληλα τραυματίστηκε το

εξωτερικό τους περίβλημα για να επιταχυνθεί η βλάστηση. Το πρωτόκολλο επιφανειακής αποστείρωσης και προβλάστησης που επιλέχθηκε είναι το ακόλουθο:

1. Τοποθέτηση των σπερμάτων *R. pseudoacacia* σε πυκνό θειικό οξύ (H_2O_4) για χρονική διάρκεια 60 λεπτών.
2. Έκπλυση των σπερμάτων με απιονισμένο νερό τρεις φορές διάρκεια 10 λεπτών η κάθε μία για να απομακρυνθούν όποια κατάλοιπα θειικού οξέως
3. Εμβάπτιση των σπερμάτων σε διάλυμα 3% υποχλωριόδου νατρίου ($NaOCl$) για χρονική διάρκεια 10 λεπτών
4. Έκπλυση των σπερμάτων με αποστειρωμένο απιονισμένο νερό έξι φορές με διάρκεια 30 δευτερολέπτων η κάθε μία για να απομακρυνθούν όποια κατάλοιπα υποχλωριόδου νατρίου
5. Μεταφορά των σπερμάτων υπό ασηπτικές συνθήκες σε τρυβλία που περιείχαν άγαρ 1.5%
6. Τποθέτηση των τρυβλίων στους $4^{\circ}C$ για χρονικό διάστημα 24 ωρών.
7. Μεταφορά των τρυβλίων σε σκοτεινό θάλαμο ανάπτυξης σε θερμοκρασία δωματίου για χρονικό διάστημα 48 ωρών

2.6.3 Ανάπτυξη και μόλυνση των νεαρών φυταρίων

Μετά την βλάστηση των σπόρων, επιλέχθηκαν 90 φυτάρια από κάθε οικοτύπο, και ανά δέκα μολύνθηκαν με το ίδιο απομονωμένο και χαρακτηρισμένο βακτηριακό στέλεχος. Η επιλογή των στελεχών για την μόλυνση έγινε με γνώμονα δύο ιδιότητές τους, την ιδιότητα αζωτοδέσμευσης και δημιουργίας φυματίων που επιβεβαιώθηκαν μοριακά και την ανεκτικότητα του εκάστοτε στελέχους στην καταπόνηση αλατότητας που ποσοτικοποιήθηκε μέσω της υγρής και στερεής καλλιέργειας αυτών σε διαβαθμισμένες συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου.

Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν δοχεία ανάπτυξης μικρού όγκου στα οποία τοποθετήθηκε μείγμα σε αναλογία 1:1 αποστειρωμένης άμμου και αποστειρωμένου περλίτη και ένα βλαστημένο φυτάριο στο κάθε ένα. Η μόλυνση πραγματοποιήθηκε με έκχυση 1 mL υγρής καλλιέργειας του κάθε στελέχους. Ανά εννέα φυτάρια του κάθε οικοτύπου χρησιμοποιήθηκε το ίδιο βακτηριακό στέλεχος και κάθε ομάδα μολυσμένων φυταρίων απομονώθηκε με χρήση προστατευτικού περιβλήματος από τα υπόλοιπα ούτως ώστε να αποφευχθούν τυχόν επιμολύνσεις. Ακόμα σε δέκα φυτάρια του κάθε οικοτύπου δεν πραγματοποιήθηκε μόλυνση για να χρησιμοποιηθούν σαν δείγματα ελέγχου, παράλληλα σε δέκα φυτάρια του κάθε οικοτύπου πραγματοποιήθηκε μόλυνση με το γνωστό στέλεχος HAMBI. Η διαδικασία της μόλυνσης επαναλήφθηκε μετά το πέρας 15 ημερών για να βεβαιωθεί η μόλυνση των εκφύτων με τα επιθυμητά στελέχη. Η ανάπτυξη των νεαρών φυταρίων έγινε σε ελεγχόμενες συνθήκες εντός εργαστηρίου, με θερμοκρασία $25^{\circ}C$ και διάρκεια ημέρας 16 ωρών. Το πότισμα των εκφύτων, κατά τις πρώτες ημέρες μόλυνσης (4 ημέρες) πραγματοποιούνταν, ανά 1 ημέρα με 5mL θρεπτικού διαλύματος B&D 50% για τα μολυσμένα και 100% για τα φυτάρια ελέγχου. Ενώ μετά το πέρας των τεσσάρων αυτών ημερών το πότισμα πραγματοποιούνταν, ανά 2 ημέρες εναλλάξ, με 10mL θρεπτικού διαλύματος B&D χωρίς

αζωτούχα πηγή για τα μολυσμένα, με το πλήρες διάλυμα B&D για τις σειρές ελέγχου και απεσταγμένου νερού για 45 ημέρες.

Η πειραματική διάταξη ήταν η ακόλουθη:

Οικότυπος BD και αντίστοιχη μόλυνση	Οικότυπος SD και αντίστοιχη μόλυνση
BD Y.P. 1.2.2	SD Y.P. 1.2.2
BD Y.P. 1.3.1	SD Y.P. 1.3.1
BD Y.P. 2.2.2	SD Y.P. 2.2.2
BD Y.P. 3.6.4	SD Y.P. 3.6.4
BD Y.P. 4.1.2	SD Y.P. 4.1.2
BD Y.P. 5.3.3	SD Y.P. 5.3.3
BD Y.P. 5.4.3	SD Y.P. 5.4.3
BD HAMBI	SD HAMBI
BD control	SD control

2.6.3.1 Θρεπτικά υλικά για την πρόβλαση και την ανάπτυξη των φυταρίων

Στερεό υπόστρωμα ανάπτυξης με άγαρ για προβλάση
Τρυβλία 1.5% άγαρ.

Σε 800mL dH₂O διαλύονται 12g άγαρ.

Διάλυμα B&D (full nitrogen)

Για την παρασκευή 1L διαλύματος B&D αναμιγνύονται

- 979.5μL dH₂O
- 10mL CaCl₂ 2H₂O 0,1M,
- 0,5mL KH₂PO₄ 1M,
- 0,25mL MgSO₄ 7H₂O 1M,
- 2,5mL K₂SO₄ 0,1M,
- 1mL κιτρικού σιδήρου 10mM,
- 1mL ιχνοστοιχείων,
- 5mL KNO₃ 1M
- 1mL NH₄NO₃ 1M.

Διάλυμα B&D (50% nitrogen)

Για την παρασκευή 1L διαλύματος B&D αναμιγνύονται

- 979.5μL dH₂O
- 10mL CaCl₂ 2H₂O 0,1M,
- 0,5mL KH₂PO₄ 1M,
- 0,25mL MgSO₄ 7H₂O 1M,
- 2,5mL K₂SO₄ 0,1M,
- 1mL κιτρικού σιδήρου 10mM,
- 1mL ιχνοστοιχείων,
- 2.5mL KNO₃ 1M
- 0.5mL NH₄NO₃ 1M.

2.7 Βιομετρία και μέτρηση δραστηριότητας νιτρογενάσης

2.7.1 Βιομετρία

Μετά το πέρας 45 ημερών ξεκίνησε η διαδικασία συγκομιδής, βιομετρίας των φυτών και μέτρησης της δραστηριότητας της νιτρογενάσης των βακτηριοειδών. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε σε χρονικό διάστημα 8 ημερών. Στην διάρκεια αυτών των 8 ημερών πραγματοποιείται πότισμα των φυτών με 5mL ημερησίως με το θρεπτικό διάλυμα B&D 50% αζώτου. Κάθε ημέρα επιλέγονταν έξι φυτάρια με τυχαίο τρόπο από κάθε ομάδα δέκα φυταρίων του κάθε οικοτύπου που είχαν μολυνθεί με το ίδιο στέλεχος, τα νεαρά φυτά αυτά συλλέχθηκαν, πλυθήκαν με χρήση απιονισμένου νερού και μεταφέρθηκαν σε αεροστεγή δοχεία χωρητικότητας 30 mL ούτως ώστε να μετρηθεί η δραστηριότητα της νιτρογενάσης όπως θα αναλυθεί στην συνέχεια.

Μετά την μέτρηση της δραστηριότητας της νιτρογενάσης, μετρήθηκε το ύψος των φυταρίων, ο αριθμός των φυματίων τους, το νωπό βάρος της ρίζας, των φυματίων και του υπέργειου τμήματος του φυτού. Οι ζυγίσεις πραγματοποιήθηκαν με ζυγό ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων. Η μέτρηση του ύψους του εκάστοτε φυτού έγινε με χρήση του προγράμματος ImageJ.

2.7.2 Δραστηριότητα Νιτρογενάσης

Για την μέτρηση της δραστηριότητας της νιτρογενάσης χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της αέριας χρωματογραφίας (Gas Chromatography, GC) για την μέτρηση της βιομετατροπής ακετυλενίου ($\text{H}-\text{C}\equiv\text{C}-\text{H}$) σε αιθυλένιο ($\text{H}_2\text{C}=\text{CH}_2$). Η έμμεση μέτρηση της νιτρογενάσης με αυτή την πειραματική διαδικασία είναι βασισμένη σε παρατηρήσεις των Dilworth (1966) και Schollhorn and Burris (1967), ότι το ένζυμο αυτό μετέτρεπε υπόστρωμα ακετυλενίου σε αιθυλένιο.

Η διαδικασία μέτρησης περιγράφεται ως εξής:

- Τοποθέτηση με χρήση ένεσης στο εκάστοτε αεροστεγές δοχείο, που περιέχει ολόκληρο το νεαρό φυτάριο μαζί με τα φυμάτιά του, 3 mL αιθυλενίου σε συνολική συγκέντρωση 10% v/v.
- Επώαση των δοχείων στους 37°C για χρονικό διάστημα 1 ώρας.
- Αφαίρεση 1mL αερίου από το δοχείο με χρήση φαρμακευτικής σύριγγας μικρού διαμετρήματος
- Φόρτωση του αερίου στον αέριο χρωματογράφο
- Καταγραφή αποτελεσμάτων

Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε 3 φορές για κάθε δείγμα, μια μέτρηση ανά ώρα.

Με βάση τα αποτελέσματα της αέριας χρωματογραφίας και χρήση και εφαρμογή του ακόλουθου τύπου προκύπτει η δραστηριότητα νιτρογενάσης σε απόλυτο αριθμό για το κάθε φυτάριο.

$$\frac{\mu\text{mole παραγμένου αιθυλενίου}}{\text{ύψος φυταρίου} \times \text{νωπό βάρος φυματίων}}$$

2.8 Συγκριτική γονιδιωματική

Επιλέχθηκαν τρία βακτηριακά στελέχη για πλήρη αλληλούχιση γονιδιώματος με τεχνολογίες αλληλούχισης νέας γενεάς. Τα στελέχη αυτά επιλέχθηκαν με βάση την ανεκτικότητα σε καταπόνηση αλατότητας, την δυνατότητά τους να δομούν φυμάτια καθώς και την δραστικότητα της νιτρογενάσης τους. Πιο συγκεκριμένα επιλέχθηκαν τα απομονωμένα στελέχη YP222, YP412 και YP364. Τα στελέχη YP222 και YP412, όπως φαίνεται στην επόμενη ενότητα παρουσιάζουν εξαιρετική απόκριση και βιωσιμότητα υπό καταπόνηση αλατότητας ενώ το στέλεχος YP364 φαίνεται να είναι ευαίσθητο στην καταπόνηση αυτή. Παράλληλα και τα τρία αυτά στελέχη δομών φυμάτια καθώς αλληλεπιδρούν με το φυτό *Robinia pseudoacacia*. Ο λόγος της επιλογής αυτών των στελεχών είναι η συγκριτική μελέτη του γονιδιώματος τους ούτως ώστε να φανεί ποια γονίδια αυτών επηρεάζουν τον διαφορετικό φαινότυπο που παρατηρείται. Αναμένουμε να εντοπίσουμε περισσότερα γονίδια συσχετιζόμενα με γνωστούς μηχανισμούς άμυνας έναντι αλατότητας στα ανεκτικά στελέχη και λιγότερα στο ευαίσθητο. Πραγματοποιήθηκε απομόνωση DNA από τα στελέχη και αλληλούχιση νέας γενεάς.

Η απομόνωση γενομικού DNA πραγματοποιήθηκε με χρήση CTAB ως εξής:

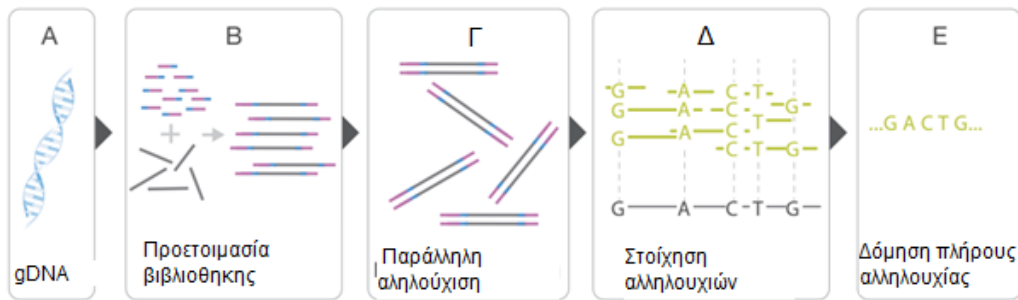
- Προσθήκη σε erppendorf 200 μl CTAB [(cetyl trimethyl ammonium bromide) extraction buffer (0.1 M Tris-HCl με pH=8, 0.02 M EDTA (Ethylene diamine tetra acetic acid) pH=8, 1.4 M NaCl, 2 % w/v CTAB, 1 % w/v PVP-40 (Polyvinyl pyrrolidone με μέσο μοριακό βάρος 40.000)], 3μl β-μερκαπτοαιθανόλη (που βοηθάει το σπάσιμο των δισουλφιδικών δεσμών), 50μl προτεάσης (για να σπάσουν οι πρωτεΐνες, που ενδεχομένως μπορούν να επηρεάσουν την αλληλούχιση) και 50μL RNAσης (για την απομάκρυνση RNA) τα οποία είχαν προθερμανθεί στους 57 ο C.
- Λειοτριβήση με πλαστικό έμβολο μέσα σε erppendorf, παρουσία 200 μl CTAB extraction buffer, . Βακτηριακή αποικίας του εκάστοτε στελέχους.
- Ανακίνηση και επώαση στους 65 ο C για 10-30 min.
- Προσθήκη ίσου όγκου διαλύματος Sevag (χλωροφόρμιο:ισοαμυλική αλκοόλη=24:1) και καλή ανάμιξη με χρήση vortex.
- Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 2 min σε θερμοκρασία δωματίου
- Μεταφορά της υδατικής (πάνω) φάσης σε νέο erppendorf.
- Προσθήκη 0.7 όγκου ισοπροπανόλης. Ανάμιξη με αναστροφή του erppendorf (10-15 φορές) και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min.
- Φυγοκέντρηση για 15 min στις 13.000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου και αφαίρεση υπερκειμένου.
- Πλύσιμο ιζήματος DNA με 200-300 μl 70 % αιθανόλης.
- Φυγοκέντρηση για 5 min στις 13.000 rpm στους 4 ο C.
- Αφαίρεση υπερκειμένου με προσοχή (το ίζημα ξεκολλά εύκολα).
- Επαναφυγοκέντρηση (spin down) για την αφαίρεση όσο το δυνατόν περισσότερης αιθανόλης.
- Ξήρανση ιζήματος σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 10 min.
- Επαναδιάλυση ιζήματος σε 40-50 μl ddH 2 O ή TE.
- Επώαση στον πάγο για 10 min, vortex, spin down, και αποθήκευση στους -20 ο C.

2.8.1 Αλληλούχιση νέας γενεάς (Next Generation Sequencing, NGS):

Η αλληλούχιση νέας γενεάς είναι παρόμοια με την αλληλούχιση με βάση το Sanger ή την αλληλούχιση με ηλεκτροφόρηση. Οι βάσεις ενός μικρού τμήματος της DNA ταυτοποιούνται

διαδοχικά από τα σήματα που εκπέμπονται καθώς κάθε θραύσμα επανασυντίθεται από ένα πρότυπο κλώνο DNA. Η NGS επεκτείνει αυτή τη διαδικασία σε εκατομμύρια αντιδράσεις με μαζικά παράλληλο τρόπο, αντί να περιορίζεται σε ένα ή λίγα θραύσματα DNA. Το γεγονός αυτό επιτρέπει την ταχεία αλληλούχιση μεγάλων τμημάτων DNA, με τα πιο πρόσφατα όργανα να μπορούν να παράγουν εκατοντάδες γιγαβάσεις δεδομένων σε μία μόνο εκτέλεση αλληλούχισης. Στην περίπτωση μας πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση γενομικού DNA (gDNA). Το gDNA κατακερματίζεται πρώτα σε μια βιβλιοθήκη μικρών τμημάτων και αλληλουχίζεται. Οι νεοταυτοποιημένες σειρές βάσεων, που ονομάζονται reads, επανασυντίθενται στη συνέχεια χρησιμοποιώντας ένα γνωστό γονιδίωμα αναφοράς ως ικρίωμα ή συναρμολογούνται μαζί με τη χρήση προηγμένων υπολογιστικών τεχνικών εάν δεν υπάρχει διαθέσιμο γονιδίωμα αναφοράς (de novo sequencing). Το πλήρες σύνολο των ευθυγραμμισμένων αναγνώσεων αποκαλύπτει ολόκληρη τη γονιδιωματική αλληλουχία του δείγματος. Μόλις προετοιμαστεί η βιβλιοθήκη του δείγματος, όλα τα βήματα αλληλούχισης και ανάλυση των δεδομένων μπορούν να εκτελεστούν σε ένα μόνο όργανο, διευκολύνοντας την ταχεία ανάλυση.

Παρατίθεται ακολούθως μια επεξηγηματική εικόνα της διαδικασίας:



Εικόνα 2.8.1: Αλληλούχιση νέας γενεάς

2.8.2 Αλληλούχιση κατά ζεύγη (paired-end)

Η αλληλούχιση κατά ζεύγη της Illumina είναι μια θεμελιώδης και ευρέως αποδεκτή μέθοδος αλληλούχισης DNA που έχει φέρει επανάσταση στην έρευνα της γονιδιωματικής. Η τεχνική αυτή περιλαμβάνει διάφορα βασικά βήματα για τη δημιουργία ολοκληρωμένων και ακριβών δεδομένων αλληλουχίας DNA. Πρώτον, το DNA-στόχος κατακερματίζεται σε μικρότερα κομμάτια, που συνήθως κυμαίνονται από μερικές εκατοντάδες έως μερικές εκατοντάδες ζεύγη βάσεων σε μήκος. Στη συνέχεια, προσαρμόζονται προσαρμογείς αλληλούχισης και στα δύο άκρα αυτών των τμημάτων DNA.

Το χαρακτηριστικό "pair-end" της αλληλούχισης Illumina αναφέρεται στη διαδικασία αλληλούχισης και των δύο άκρων αυτών των τμημάτων ανεξάρτητα, με αποτέλεσμα δύο σύνολα αναγνώσεων αλληλουχίας για κάθε αρχικό τμήμα DNA. Η προσέγγιση αυτή προσφέρει αρκετά σημαντικά πλεονεκτήματα. Πρώτον, παρέχει πλεονασμό, ο οποίος ενισχύει την αξιοπιστία και την ακρίβεια των δεδομένων αλληλούχισης.

Έχοντας δύο αλληλουχίες ανά θραύσμα DNA, οι ερευνητές μπορούν να διασταυρώσουν τα δεδομένα, συμβάλλοντας στη διόρθωση των σφαλμάτων και στη βελτίωση της ποιότητας της τελικής αλληλουχίας. Επιπλέον, η αλληλούχιση κατά ζεύγη επιτρέπει την ανίχνευση δομικών παραλλαγών εντός του DNA. Η απόσταση μεταξύ των ζευγαρωτών αναγνώσεων μπορεί να αποκαλύψει πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με τις εισαγωγές, τις διαγραφές, τις διπλασιασμούς και τις αναστροφές στο γονιδίωμα, ρίχνοντας φως σε δομικές αλλαγές που μπορεί να σχετίζονται με γενετικές διαταραχές ή άλλες γονιδιωματικές παραλλαγές. Επιπροσθέτως, η αλληλούχιση κατά ζεύγη βοηθά στη συναρμολόγηση του γονιδιώματος, η οποία είναι ζωτικής σημασίας για έργα de novo αλληλούχισης ή για τη συναρμολόγηση πολύπλοκων γονιδιωμάτων. Έχοντας αλληλουχίες και από τα δύο άκρα κάθε θραύσματος, οι ερευνητές μπορούν να συναρμολογήσουν με μεγαλύτερη ακρίβεια ολόκληρο το γονιδίωμα, γεφυρώνοντας κενά και επιλύοντας πολύπλοκες ή επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες που θα ήταν δύσκολο με την αλληλούχιση ενός άκρου μόνο. Η τεχνολογία της Illumina φημίζεται για την οικονομική της αποδοτικότητα και τις δυνατότητες υψηλής απόδοσης, καθιστώντας την ακρογωνιαίο λίθο σε διάφορες εφαρμογές γονιδιωματικής. Έχει συμβάλει καθοριστικά στην αποκρυπτογράφηση της γενετικής βάσης των ασθενειών, στη μελέτη της γενετικής των πληθυσμών, στην κατανόηση της πολυπλοκότητας των μικροβιακών κοινοτήτων σε περιβαλλοντικά δείγματα και στην προώθηση πολλών άλλων τομέων της γενετικής και της γονιδιωματικής έρευνας. Ως αποτέλεσμα, η αλληλούχιση κατά ζεύγη της Illumina συνεχίζει να αποτελεί ένα απαραίτητο εργαλείο που έχει συμβάλει σημαντικά στην κατανόηση του γενετικού κώδικα και στις ποικίλες εφαρμογές του στις επιστήμες της ζωής.



Εικόνα 2.8.2: Αλληλούχιση κατά ζεύγη

Έπειτα χρησιμοποιήθηκε το online εργαλείο PATRIC της διαδικτυακής πλατφόρμας BV-BRC για την ανάλυση καθώς και το πρόγραμμα geneious.

2.8.3 Εργαλείο PATRIC / BV-BRC:

Το Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center (BV-BRC) (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27899627/>) είναι ένα πληροφοριακό σύστημα που έχει σχεδιαστεί για να υποστηρίζει το έργο της βιοϊατρικής ερευνητικής κοινότητας σχετικά με τις βακτηριακές και ιογενείς

μολυσματικές ασθένειες μέσω της ενσωμάτωσης ζωτικής σημασίας πληροφοριών για παθογόνα με πλούσια δεδομένα και εργαλεία ανάλυσης. Το BV-BRC συνδυάζει τα δεδομένα, την τεχνολογία και τις εκτεταμένες κοινότητες χρηστών από δύο μακροχρόνια εργαλειακά συστήματα: PATRIC, το βακτηριακό σύστημα, και IRD/ViPR, τα ιικά συστήματα. Εκτός από εκατοντάδες χιλιάδες βακτηριακά γονιδιώματα στο PATRIC και πάνω από ένα εκατομμύριο ιικά γονιδιώματα στο IRD/ViPR, οι δύο πόροι φιλοξενούν δεδομένα σχετικά με τη δομή και τη λειτουργία των πρωτεϊνών, κλινικές μελέτες, στόχους και ανθεκτικότητα στα φάρμακα, επιδημιολογία και άλλα χαρακτηριστικά και παρέχουν εργαλεία ανοικτού κώδικα για την ανάλυση δεδομένων και τον γονιδιωματικό σχολιασμό.

Στο εργαλείο PATRIC φορτώθηκαν τα δεδομένα της αλληλούχισης νέας γενεάς όπου και αναλύθηκαν. Χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο του PATRIC για την Ανασύσταση γονιδιώματος (genome assembly), για την Ανοικτού πλαισίου in silico πρόβλεψη γονιδιώματος (annotation), για την ανάλυση των υποσυστημάτων του γονιδιώματος του εκάστοτε στελέχους, εντοπίστηκαν παράλληλα διάφορα γονίδια ειδικότητας καθώς και γονίδια με αντιμικροβιακή δράση (AMR). Τέλος πραγματοποιήθηκε δημιουργία φυλλογενετικών δένδρων από το πλήρες γονιδίωμα του εκάστοτε πλήρως αλληλουχημένου βακτηρίου.

Πραγματοποιήθηκε η ακόλουθη διαδικασία:

- Φορτώθηκαν τα γενωμικά διαβάσματα (raw reads) από την τεχνολογία Illumina του εκάστοτε στελέχους στο διαδικτυακό εργαλείο Patric
- Πραγματοποιήθηκε ποιοτικός έλεγχος με τα εργαλεία της Fastqc
- Ακολούθησε «κόψιμο» των άκρων (trim) των διαβασμάτων με το εργαλείο Trim Galore
- Δοκιμάστηκαν ποικιλία εργαλείων για την ανασύσταση του γονιδιώματος (assemblers) και επιλέχθηκε μετά από σύγκριση το Unicycler
- Πραγματοποιήθηκε in silico πρόβλεψη του γονιδιώματος με βάση την προηγούμενη ανασύσταση με χρήση του Rast Tool kit (RASTtk)

Τα αποτελέσματα εξήχθησαν και χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο Geneious prime της Dotmatics (225 Franklin Street, Fl. 26. Boston, MA 02110) για περαιτέρω ανάλυση. Πρόκειται για ένα υπερσύγχρονο εργαλείο για in silico βιολογικές εφαρμογές.

2.8.4 Εργαλείο Orthovenn 3:

Χρησιμοποιήθηκε και το διαδικτυακό εργαλείο OrthoVenn3 (<https://orthovenn3.bioinfotoolkits.net/>)

Οι εξελίξεις στη συγκριτική γονιδιωματική έρευνα έχουν οδηγήσει σε αυξανόμενο ενδιαφέρον για τη μελέτη της εξέλιξης των ειδών και της γενετικής ποικιλομορφίας. Για τη διευκόλυνση αυτής της έρευνας, το OrthoVenn3 έχει αναπτυχθεί ως ένα ισχυρό, διαδικτυακό εργαλείο που επιτρέπει στους χρήστες να εντοπίζουν και να σχολιάζουν αποτελεσματικά ορθολογικές συστάδες και να συμπεραίνουν φυλογενετικές σχέσεις σε μια σειρά ειδών. Η τελευταία αναβάθμιση του OrthoVenn περιλαμβάνει αρκετά σημαντικά νέα χαρακτηριστικά, όπως η αυξημένη ακρίβεια εντοπισμού ορθολογικών συστάδων, οι βελτιωμένες δυνατότητες οπτικοποίησης για μεγάλα σύνολα δεδομένων και η προσθήκη εργαλείων φυλογενετικής ανάλυσης. Επιπλέον, το εργαλείο παρέχει πλέον διευρυμένη ανάλυση συρρίκνωσης και επέκτασης γονιδιακών οικογενειών για να βοηθήσει τους ερευνητές να κατανοήσουν καλύτερα την εξέλιξη των

γονιδιακών οικογενειών, καθώς και ανάλυση κολλητικότητας για τον εντοπισμό συντηρημένων και μεταβλητών γονιδιωματικών δομών.

1. Προετοιμασία δεδομένων εισόδου:

- Συλλέχθηκαν πρωτεϊνικές αλληλουχίες από τα μελετώμενα στελέχη σε μορφή FASTA από το εργαλείο PATRIC.

2. Φόρτωμα δεδομένων εισόδου:

- Ανέβηκαν στην διαδικτυακή πλατφόρμα τα αρχεία FASTA που περιέχουν τις πρωτεϊνικές αλληλουχίες των τριών μελετώμενων στελεχών.

3. Ανάλυση OrthoVenn3

- Με χρήση των βασικών προεπιλεγμένων παραμέτρων του OrthoVenn3 πραγματοποιήθηκε η ανάλυση.
- Αναζητήθηκαν ομοιότητες για τις συγκρίσεις all-vs-all των ανεβασμένων πρωτεϊνικών αλληλουχιών.
- Ομαδοποιήθηκαν οι πρωτεΐνες σε ορθόλογες ομάδες με βάση την ομοιότητα αλληλουχιών και τις σχέσεις ορθολογίας.

4. Εικονική απεικόνιση και ερμηνεία:

- Μόλις ολοκληρωθεί η ανάλυση, το OrthoVenn παράγει διαδραστικά εργαλεία οπτικοποίησης για τη διερεύνηση των αποτελεσμάτων.
- Το OrthoVenn παράγει συνήθως διαγράμματα Venn, τα οποία απεικονίζουν τις κοινές και μοναδικές ορθολογικές ομάδες μεταξύ των αναλυόμενων ειδών.
- Οι χρήστες μπορούν να εξερευνήσουν τις ορθόλογες συστάδες, να προβάλουν ευθυγραμμίσεις ακολουθιών και να έχουν πρόσβαση σε πρόσθετες λεπτομέρειες για περαιτέρω ανάλυση.

3. Αποτελέσματα

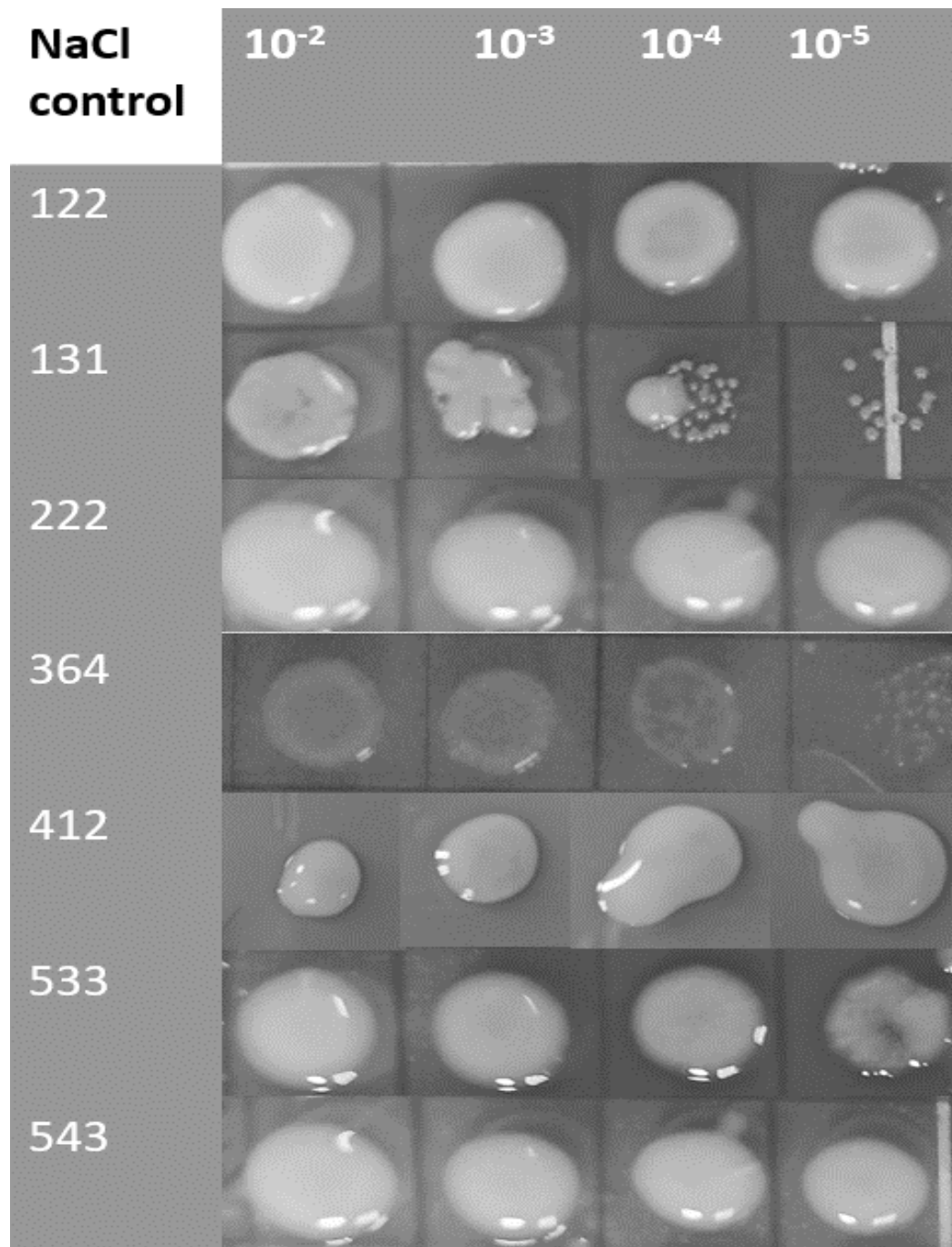
3.1 Ανάπτυξη στελεχών ριζοβίων σε συνθήκες υψηλής αλατότητας

3.1.1 Ανάπτυξη σε στερεά υποστρώματα

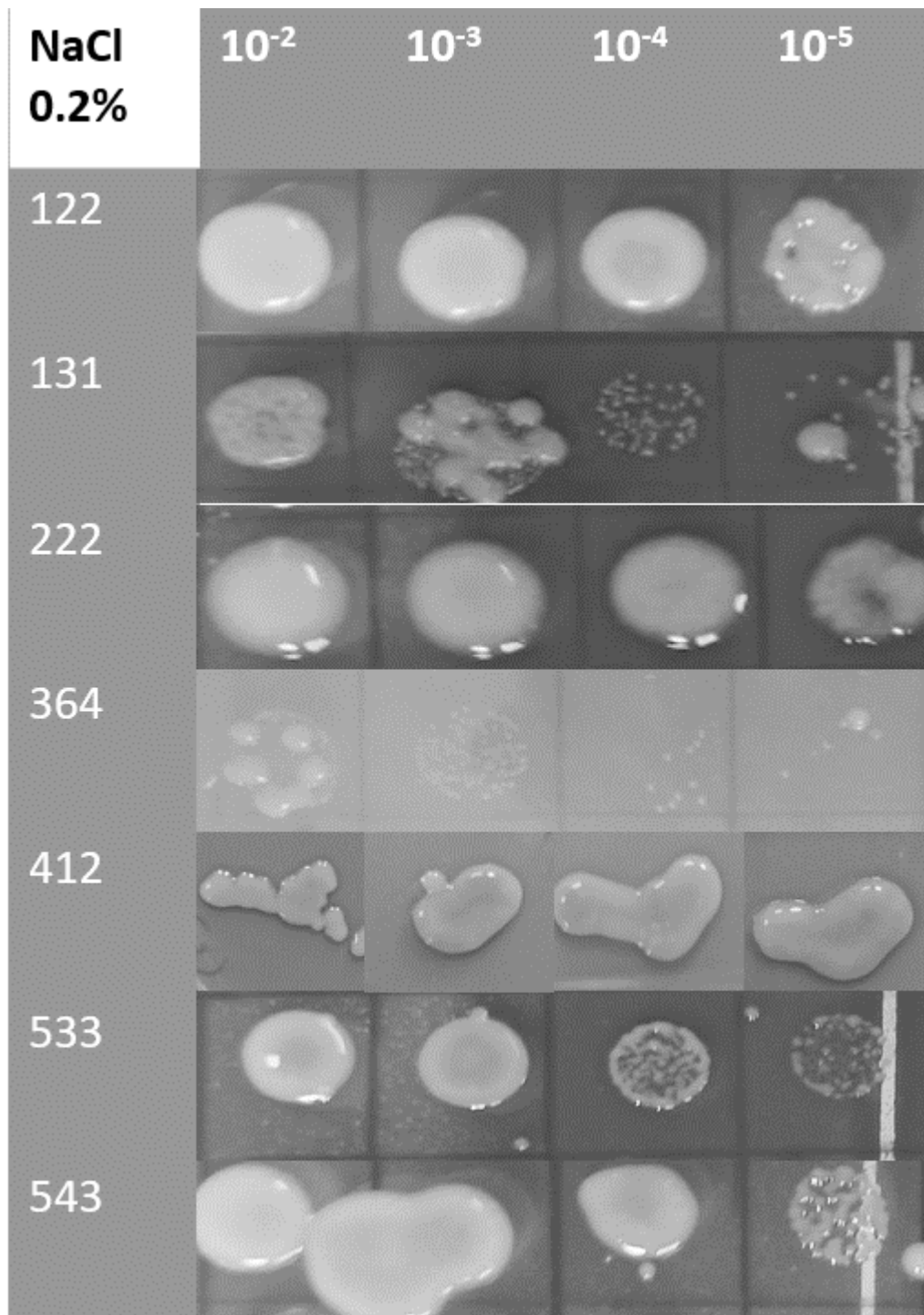
Από την αρχική μελέτη των στερεών καλλιέργειών σε θρεπτικό μέσω Yeast Manitol Extract με διαδοχικά αυξημένες συγκεντρώσεις NaCl προέκυψε πως ορισμένα στελέχη ήταν αρκετά ανθεκτικά και κατάφεραν να επιβιώσουν καλύτερα από άλλα, παράλληλα παρατηρήθηκε πως υπήρχε διαφορά στον φαινότυπο καθώς και ταχύτητα ανάπτυξης μεταξύ των στελεχών. Οι παρατηρήσεις αυτές επιβεβαιώνουν πως υπάρχει μεγάλη ποικιλομορφία μεταξύ των μελετώμενων στελεχών. Ως εκ τούτου επιλέχθηκαν ορισμένα στελέχη για περαιτέρω μελέτη.

Τα αποτελέσματα των στερεών καλλιέργειών των στελεχών YP που επιλέχθηκαν φαίνονται παρακάτω :

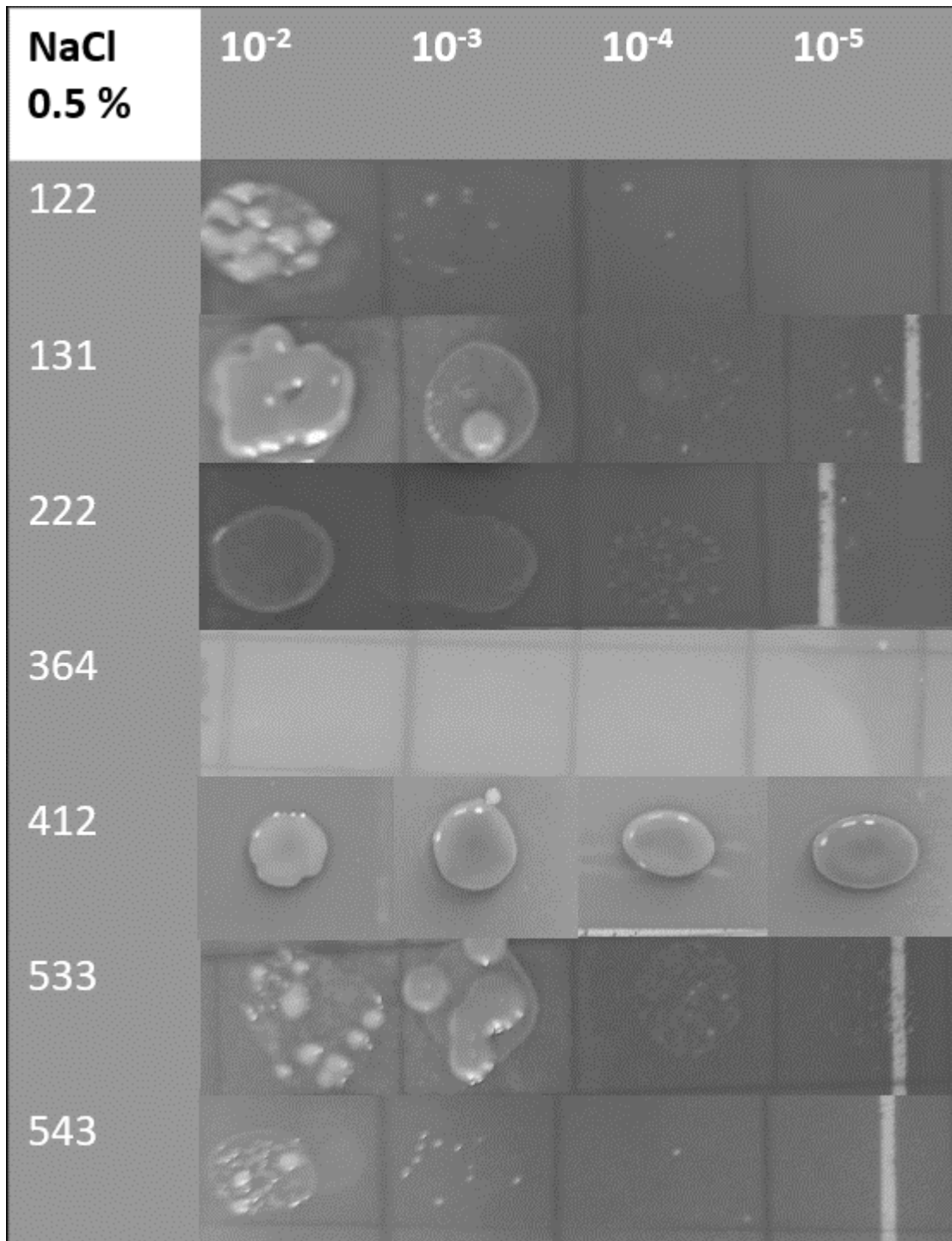
Όπου στην πρώτη στήλη φαίνονται τα στελέχη YP από πάνω προς τα κάτω YP 1.2.2 , YP 1.3.1, YP 2.2.2, YP 3.6.4, YP 4.1.2, YP 5.3.3, YP 5.4.3, ενώ κάθε επόμενη στήλη αντιστοιχεί στην αραίωση της υγρής καλλιέργειας πριν την επίστρωση των τρυβλίων.



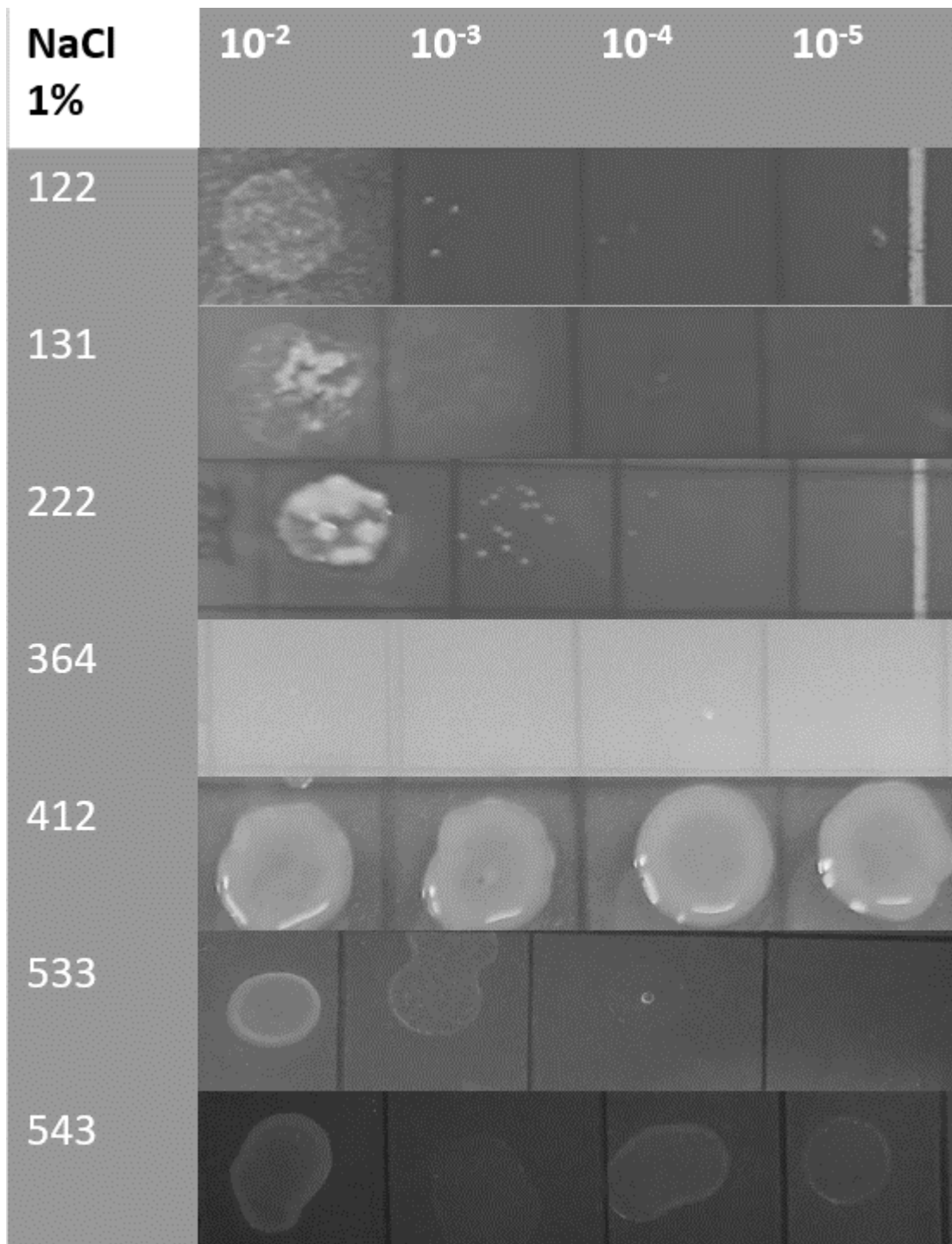
Εικόνα 3.1.1: Στερεή καλλιέργεια των στελεχών YP 1.2.2 , YP 1.3.1, YP 2.2.2, YP 3.6.4, YP 4.1.2, YP 5.3.3 & YP 5.4.3 σε YMA χωρίς επιπλέον προσθήκη NaCl



Εικόνα 3.1.2: Στερεή καλλιέργεια των στελεχών YP 1.2.2 , YP 1.3.1, YP 2.2.2, YP 3.6.4, YP 4.1.2, YP 5.3.3 & YP 5.4.3 σε YMA – 0.2% NaCl



Εικόνα 3.1.3 :Στερεή καλλιέργεια των στελεχών YP 1.2.2 , YP 1.3.1, YP 2.2.2, YP 3.6.4, YP 4.1.2, YP 5.3.3 & YP 5.4.3 σε YMA – 0.5% NaCl



Εικόνα 3.1.4: Στερεή καλλιέργεια των στελεχών YP 1.2.2 , YP 1.3.1, YP 2.2.2, YP 3.6.4, YP 4.1.2, YP 5.3.3 & YP 5.4.3 σε YMA – 1% NaCl

Σε γενικές γραμμές στελέχη που προέρχονταν από το ίδιο φυμάτιο είχαν παρόμοια χαρακτηριστικά. Τα στελέχη που επιλέχθηκαν ήταν ένα από το φυμάτιο Y.P 1.2 από το οποίο διαλέχθηκε το στέλεχος Y.P 1.2.2. Το συγκεκριμένο φάνηκε από την στερεή καλλιέργεια πως είχε μια αρκετά ικανοποιητική ανθεκτικότητα στην αλατότητα, αναπτύχθηκε μέχρι και στην συγκέντρωση 1% NaCl. Από το φυμάτιο Y.P 1.3 επιλέχθηκε το στέλεχος Y.P 1.3.1. Όλα τα στελέχη του Y.P 1.3.1 είχαν παρόμοια χαρακτηριστικά, είχαν μικρότερο ρυθμό ανάπτυξης συγκριτικά με τα υπόλοιπα στελέχη, τόσο σε θρεπτικά με υψηλή συγκέντρωση άλατος όσο και σε θρεπτικά με χαμηλή συγκέντρωση, είχαν όμως και αυτά ικανοποιητική ανθεκτικότητα στην αλατότητα. Αναπτύχθηκε και αυτό μέχρι και στην συγκέντρωση 1% NaCl. Από το φυμάτιο Y.P 2.2 επιλέχθηκε το Y.P 2.2.2 που και αυτό αναπτύχθηκε καλώς μέχρι και στην συγκέντρωση 1% NaCl. Από το φυμάτιο Y.P 3.6 δεν φάνηκε να υπάρχει κάποιο στέλεχος με αξιοσημείωτη ανθεκτικότητα στην αλατότητα και για αυτό επιλέχθηκε το Y.P 3.6.4 ως αρνητικός δείκτης για τις επόμενες πειραματικές διαδικασίες. Να σημειωθεί εδώ πως χρησιμοποιήθηκε και άλλος ένας αρνητικός δείκτης στην αλατότητα, ο οποίος είναι βιβλιογραφικά επιβεβαιωμένος, το στέλεχος HAMB1. Το φυμάτιο Y.P 4.1 παρουσίασε ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς τα στελέχη που απομονώσαμε εξ αυτού είχαν υψηλή ανθεκτικότητα στην αλατότητα, αναπτύχθηκαν δηλαδή στις στερεές καλλιέργειες ακόμη και στην υψηλή συγκέντρωση 2% NaCl όπως επίσης και οι αποικίες τους είχαν έντονο κίτρινο χρωματισμό και ήταν ιδιαίτερος επεκτατικές. Στα φυμάτια Y.P 5.3 και Y.P 5.4 παρατηρήθηκαν στελέχη με ανθεκτικότητα στην αλατότητα μέχρι και στην συγκέντρωση 1% NaCl και επιλέχθηκαν τα στελέχη Y.P 5.3.3 και Y.P 5.4.3 αντίστοιχα.

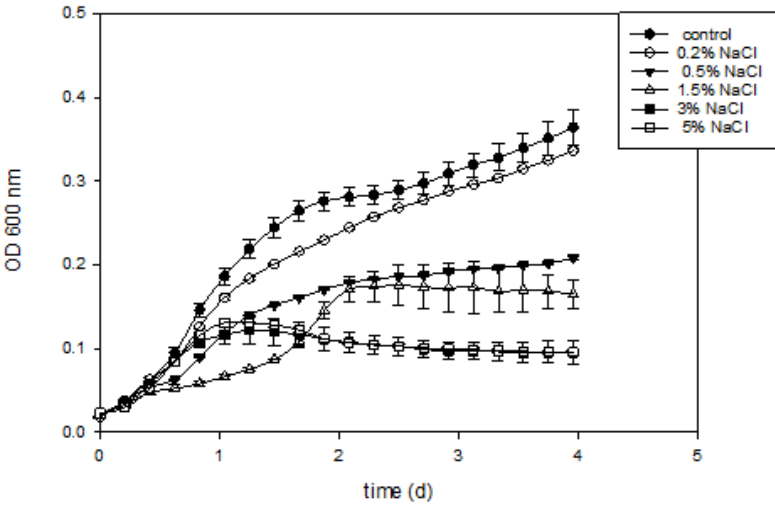
3.1.2 Κινητική βακτηριακής ανάπτυξης σε συνθήκες υψηλής αλατότητας

Ακολούθησε η υγρή καλλιέργεια αυτών των στελεχών σε διαβαθμισμένη συγκέντρωση και η κατασκευή βάσει αυτής των καμπυλών ανάπτυξης καθώς και γραφημάτων του ειδικού ρυθμού αύξησης (από εδώ και στο εξής θα αναφέρεται ως specific growth rate ή μ) του κάθε στελέχους στην διαβαθμισμένη αλατότητα. Το μ προκύπτει από την ανάλυση της κλίσης της καμπύλης ανάπτυξης στην εκθετική της φάσης.

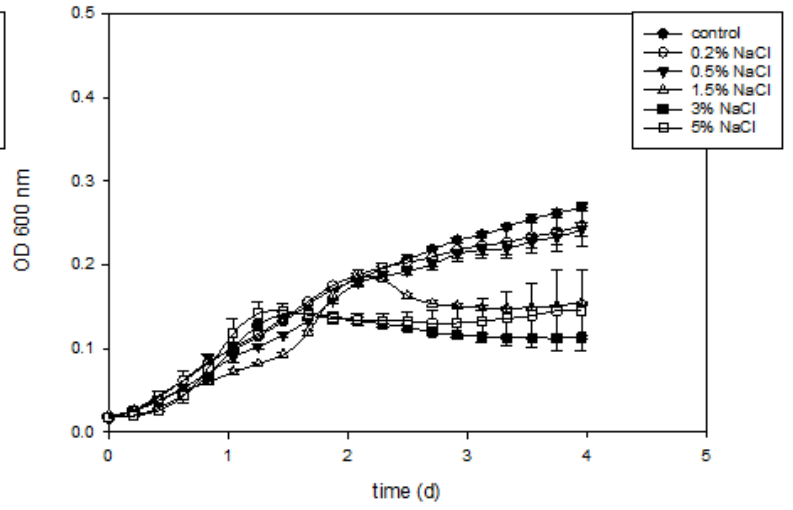
Τα αποτελέσματα των καμπυλών ανάπτυξης και ειδικού ρυθμού αύξησης (μ) των στελεχών YP 1.2.2 , YP 1.3.1, YP 2.2.2, YP 4.1.2, YP 5.3.3 και YP 5.4.3 φαίνονται παρακάτω:

Καμπύλες με βάση το εκάστοτε στέλεχος:

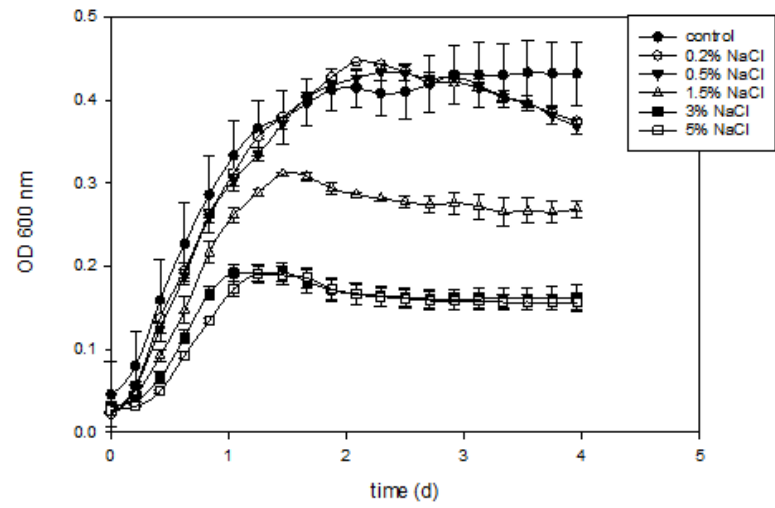
YP 122



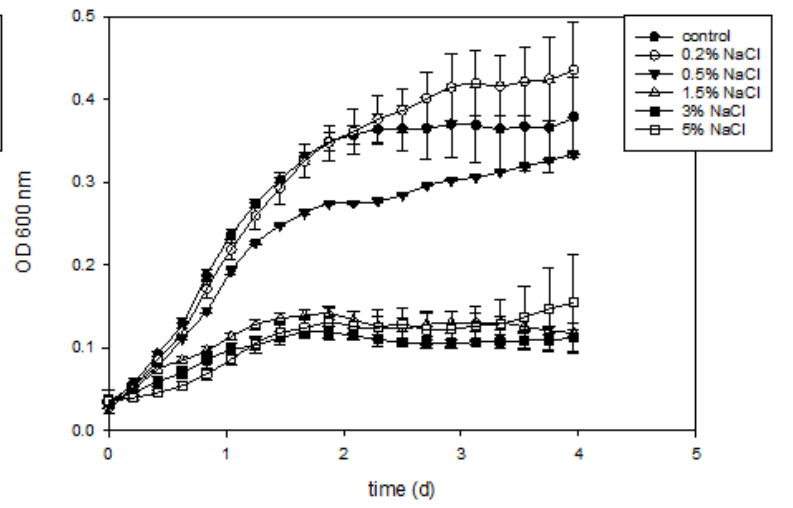
YP 131

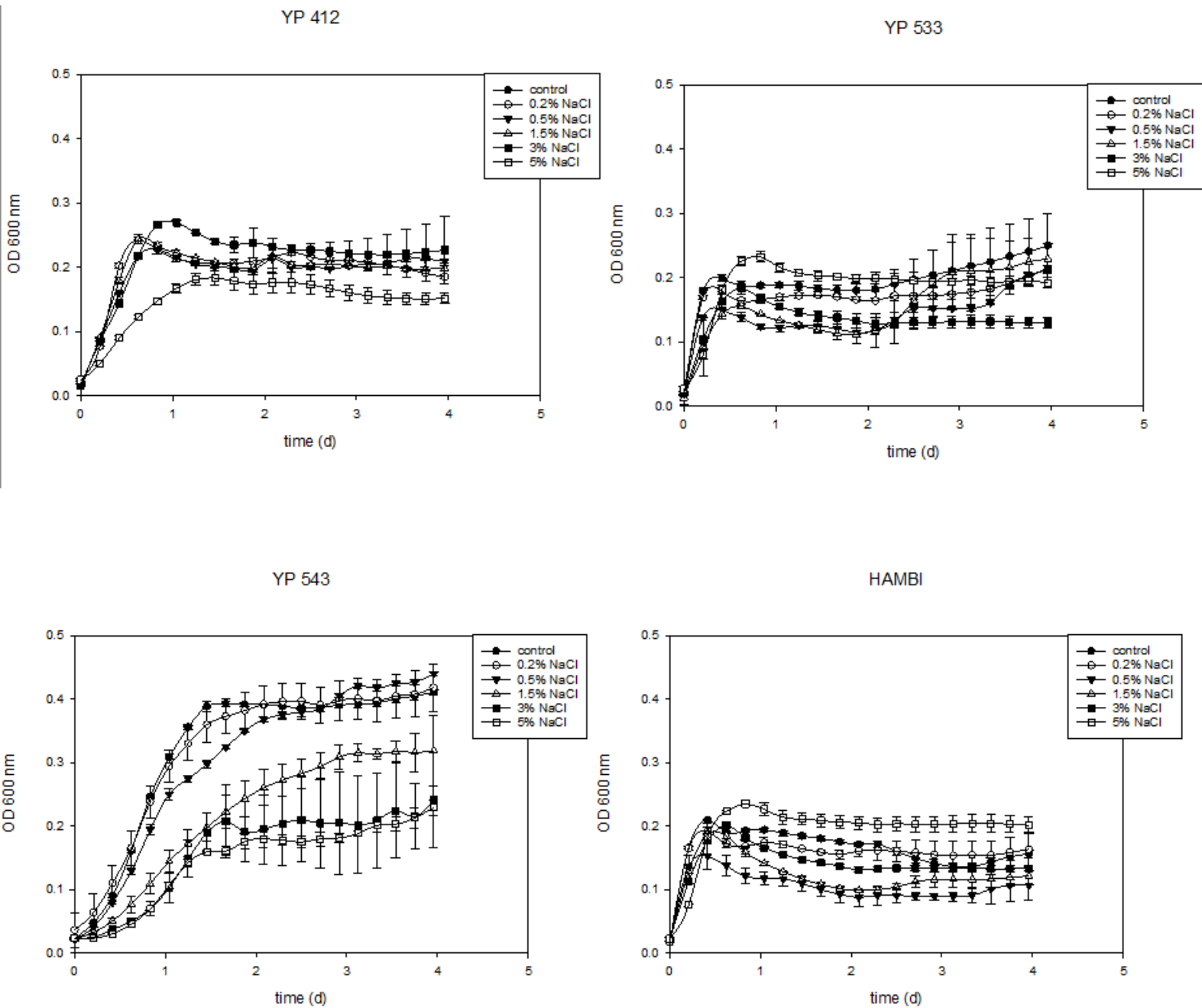


YP 222



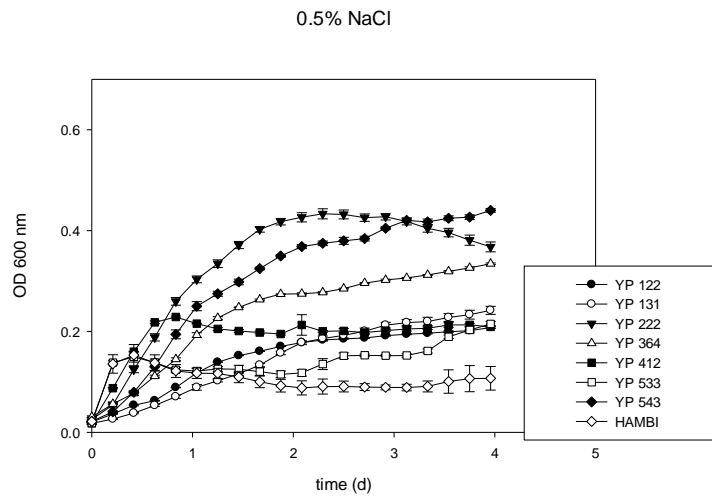
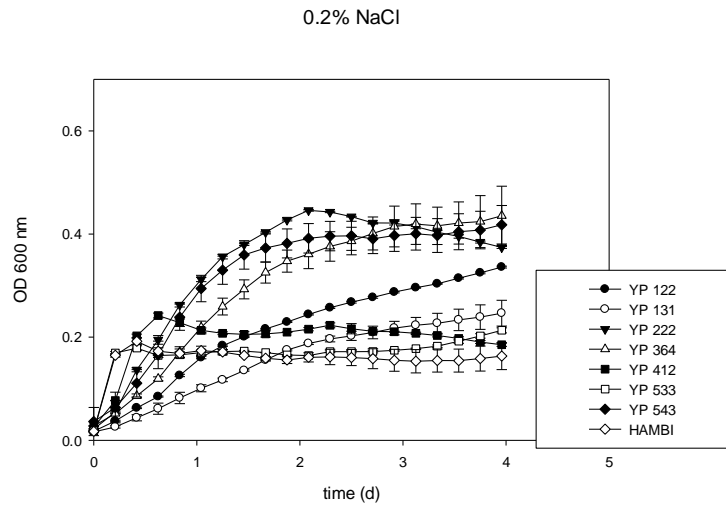
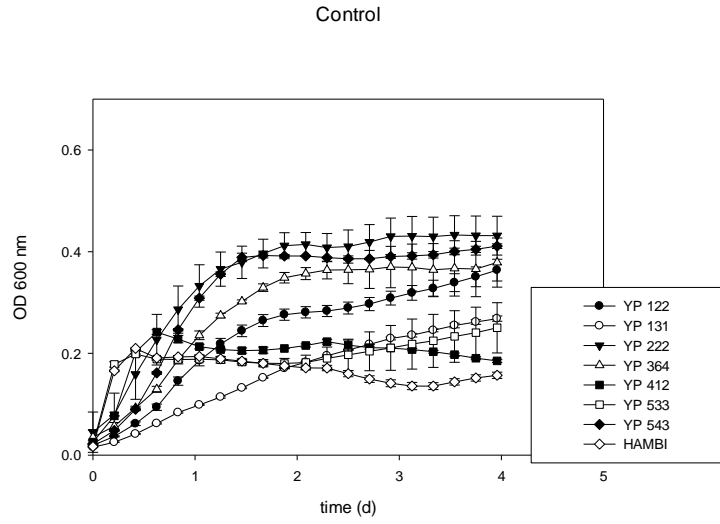
YP 364

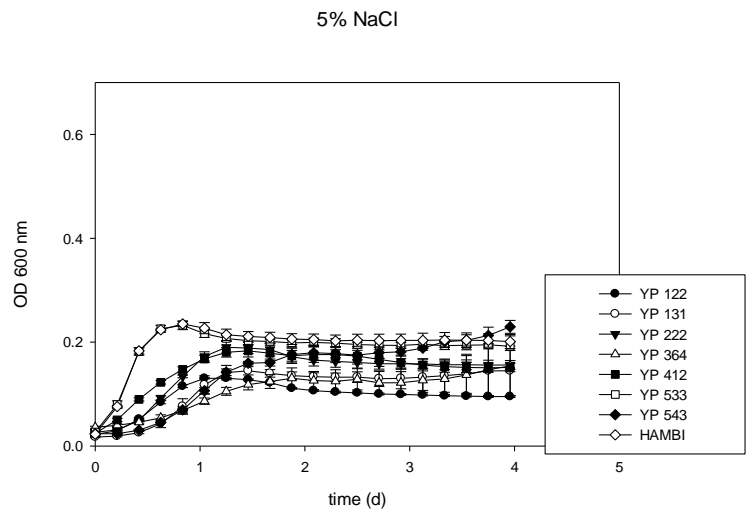
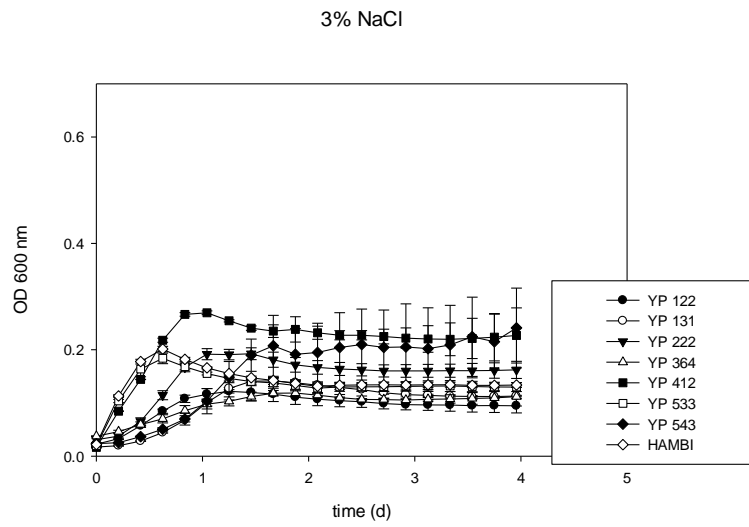
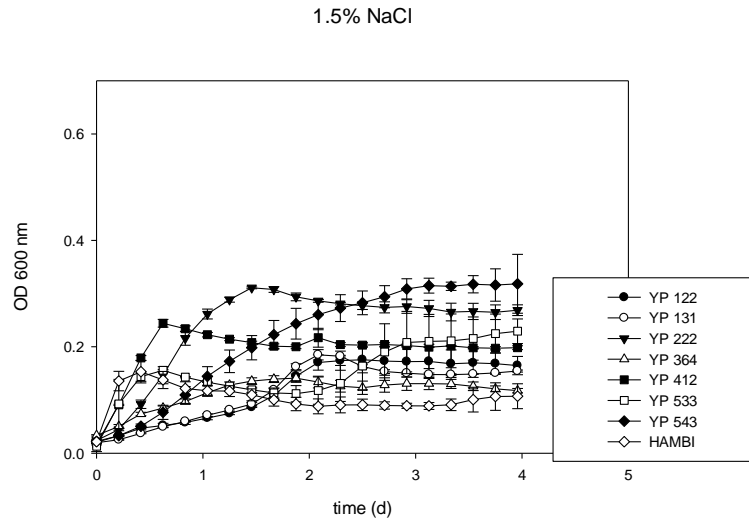


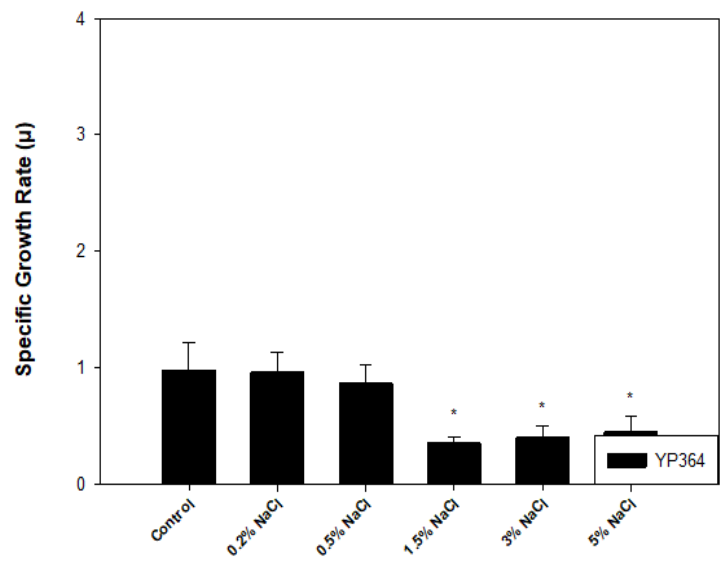
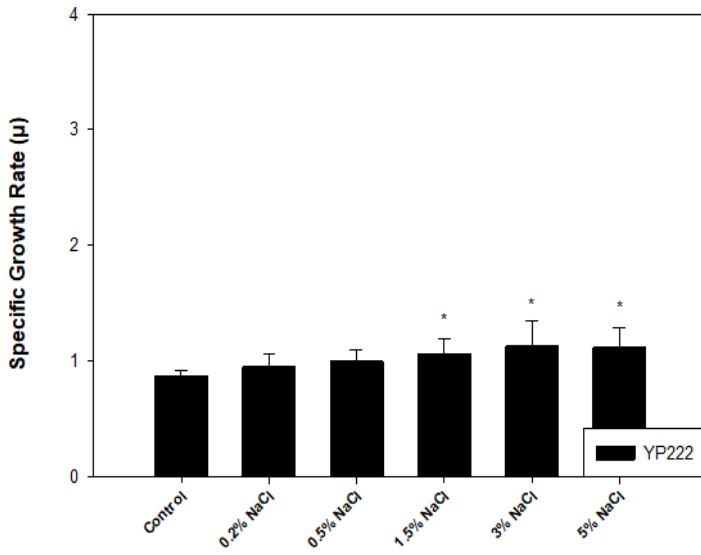
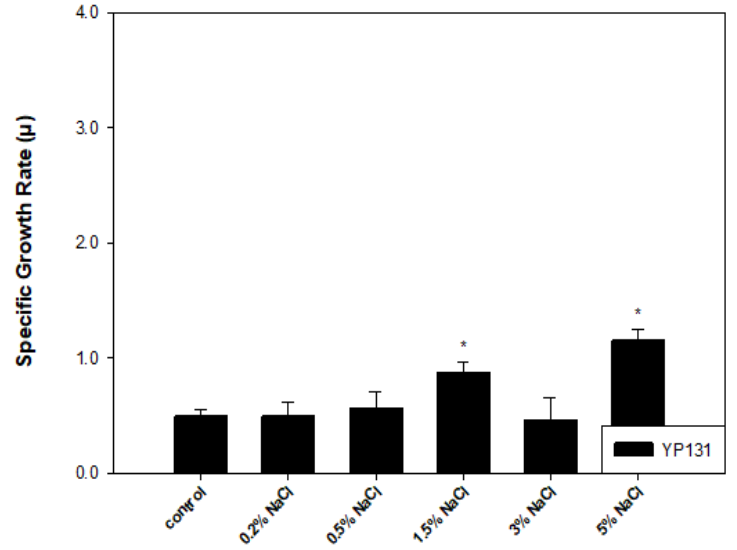
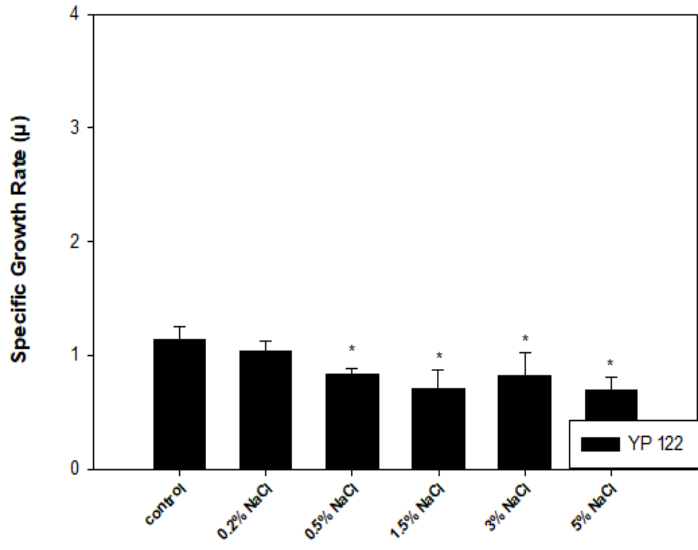


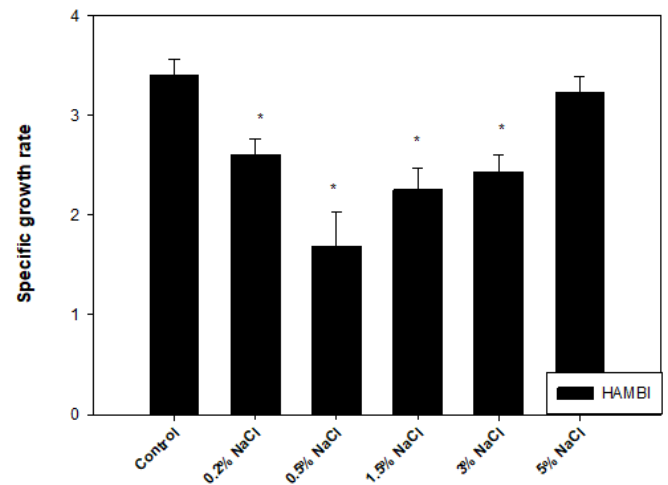
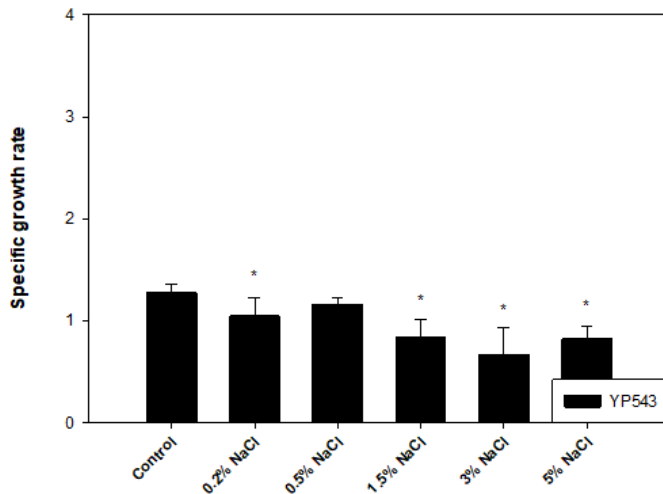
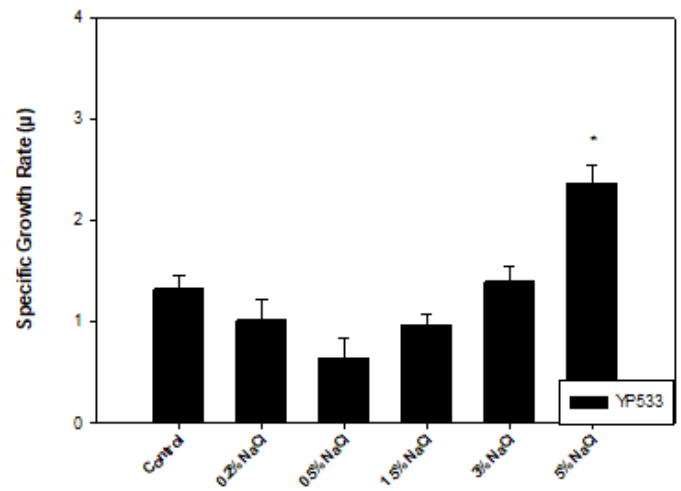
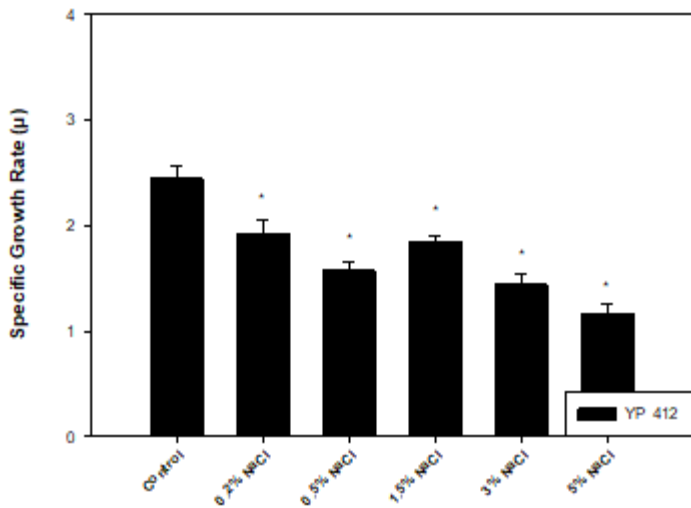
Εικόνα 3.1.5 Καμπύλες ανάπτυξης Α: στέλεχος YP 1.2.2, Β: στέλεχος YP 1.3.1, Γ: στέλεχος YP 2.2.2, Δ: στέλεχος YP 3.6.4, Ε: στέλεχος YP 4.1.2, ΣΤ: στέλεχος YP 5.3.3, Ζ: στέλεχος YP 5.4.3, Η: στέλεχος HAMBI

Παρακάτω φαίνονται οι καμπύλες ανάπτυξης των στελεχών σε υγρές καλλιέργειες με την εκάστοτε περιεκτικότητα σε χλωριούχο νάτριο









Εικ. 3.1.7: Γραφήματα με τον ειδικό ρυθμό αύξησης (specific growth rate(μ)) του εκάστοτε στελέχους

Καμπύλες ανάπτυξης A: στέλεχος YP 1.2.2, B: στέλεχος YP 1.3.1, Γ: στέλεχος YP 2.2.2, Δ: στέλεχος YP 3.6.4, Ε: στέλεχος YP 4.1.2, ΣΤ: στέλεχος YP 5.3.3, Ζ: στέλεχος YP 5.4.3, Η: στέλεχος HAMB1

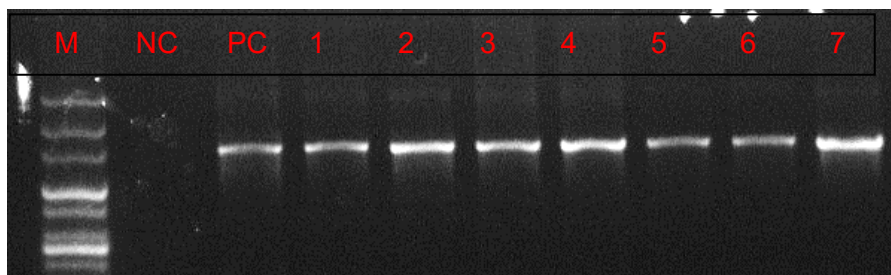
Από τις καμπύλες ανάπτυξης προκύπτει πως τα περισσότερα από τα ανθεκτικά στελέχη που επιλέχθηκαν, είναι πράγματι ανθεκτικά και πως το στέλεχος Y.P 4.1.2 φαίνεται να έχει την καλύτερη επιβίωση σε περιβάλλον με υψηλή αλατότητα. Ακόμα μετά το πέρας 6 ημερών παραμονής των στελεχών στους σωλήνες υγρής καλλιέργειας (cultivation tubes) υπό συνεχή ανάδευση στους 28 °C παρατηρήθηκε μείωση του βακτηριακού πληθυσμού ανεξαρτήτως αλατότητας, μπήκαν δηλαδή στη φάση θανάτου, με εξαίρεση τις καλλιέργειες control (χωρίς περαιτέρω προσθήκη NaCl) και την συγκέντρωση 0.2% NaCl του Y.P 4.1.2.

3.2 Φυλλογεννητική ανάλυση στελεχών

3.2.1 Ενίσχυση με PCR συμβιωτικών γονιδίων 16s για τα YP βακτηριακά στελέχη

Πραγματοποιήθηκε η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για τα 16s rRNA γονίδια των στελεχών αυτών, ούτως ώστε να ελεγχθεί εάν είναι βακτήρια. Γεγονός που επαληθεύθηκε καθώς από το απομονωμένο DNA όλων των στελεχών ενισχύθηκε το τμήμα 16s, όπως φαίνεται στα αποτελέσματα.

Τα αποτελέσματα της PCR μετά την ηλεκτροφόριση σε gel αγαρόζης φαίνονται παρακάτω:

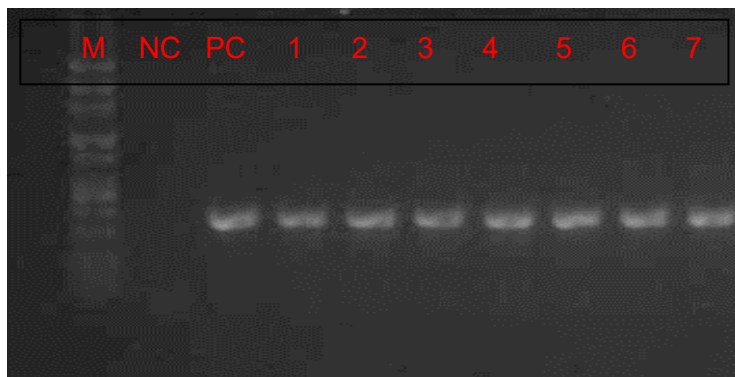


Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης των ενισχυμένων μέσω PCR γονιδίων 16s των YP βακτηριακών στελεχών. (90V – 30min) Από κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν 2μl για ηλεκτροφόρηση σε 1.2% (w/v) πηκτή αγαρόζης. Όπου M: Μάρτυρας – Midrange 100bp – 3Kbp DNA Ladder, NC: Αρνητικός μάρτυρας (No genomic DNA), PC: Θετικός μάρτυρας *Mesorhizobium loti* HAMBI, Κατά σειρά από 1 έως 7 Y.P 1.2.2, Y.P 1.3.1, Y.P 2.2.2 , Y.P 3.6.4, Y.P 4.1.2, Y.P 5.3.3 Y.P 5.4.3 .

3.2.2 Ενίσχυση με PCR συμβιωτικών γονιδίων nifH και nodA για τα YP βακτηριακά στελέχη

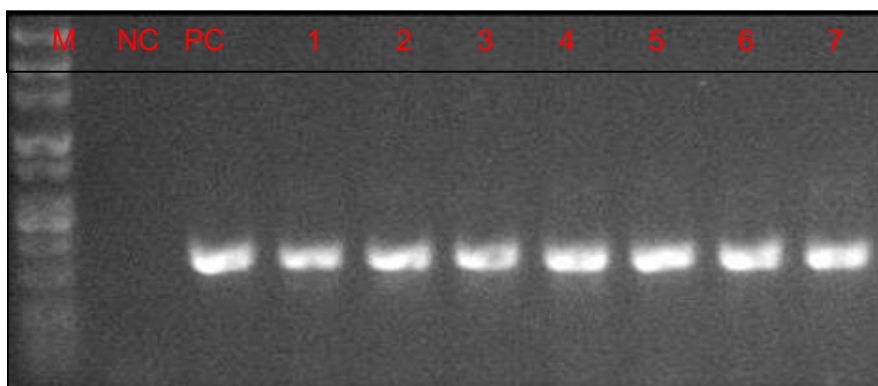
Πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με σκοπό να ενισχυθεί η περιοχή του γονιδίου *nifH*, ενίσχυση της οποίας επιβεβαιώνει την αζωτοδεσμευτική δράση των στελεχών. Καθώς το γονίδιο αυτό είναι κωδικοποιεί την αναγωγή της δινιτρογενάσης. Ακόμα η ενίσχυση της περιοχής του *nodA* γονιδίου φανερώνει και επιβεβαιώνει την δυνατότητα των στελεχών να συμβιώνουν με το φυτό δομώντας φυμάτια.

Τα αποτελέσματα της PCR μετά την ηλεκτροφόριση σε gel αγαρόζης φαίνονται παρακάτω:



Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης των ενισχυμένων μέσω PCR γονιδίων *nifH* των YP βακτηριακών στελεχών. (90V – 30min) Από κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν 2μl για ηλεκτροφόρηση σε 3% (w/v) πηκτή αγαρόζης. Όπου M: Μάρτυρας – Midrange 100bp – 3Kbp DNA Ladder, NC: Αρνητικός μάρτυρας (No genomic DNA), PC: Θετικός μάρτυρας *Mesorhizobium loti* HAMBI, Κατά σειρά από 1 έως 7 Y.P 1.2.2, Y.P 1.3.1, Y.P 2.2.2 , Y.P 3.6.4, Y.P 4.1.2, Y.P 5.3.3 Y.P 5.4.3 .

Τα αποτελέσματα της PCR στάλθηκαν για sequencing.

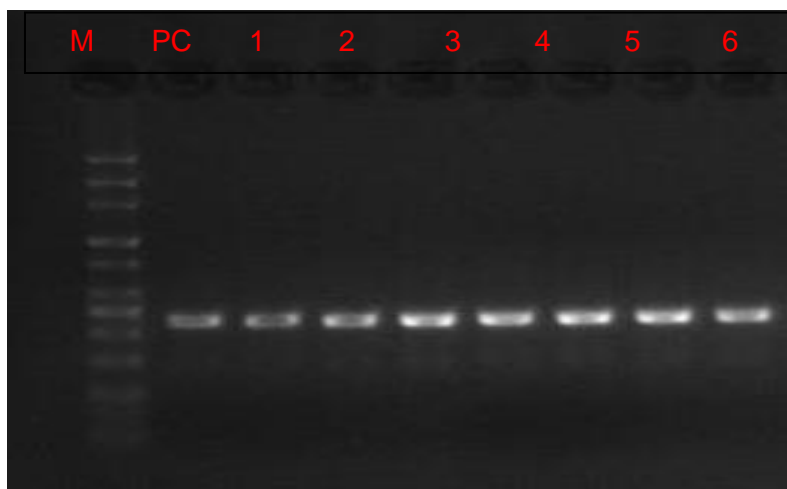


Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης των ενισχυμένων μέσω PCR γονιδίων *nodA* των YP βακτηριακών στελεχών. (90V – 40min) Από κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν 2μl για ηλεκτροφόρηση σε 2% (w/v) πηκτή αγαρόζης. Όπου M: Μάρτυρας – Midrange 100bp – 3Kbp DNA Ladder, NC: Αρνητικός μάρτυρας (No genomic DNA), PC: Θετικός μάρτυρας *Mesorhizobium loti* HAMBI, Κατά σειρά από 1 έως 7 Y.P 1.2.2, Y.P 1.3.1, Y.P 2.2.2 , Y.P 3.6.4, Y.P 4.1.2, Y.P 5.3.3 Y.P 5.4.3.

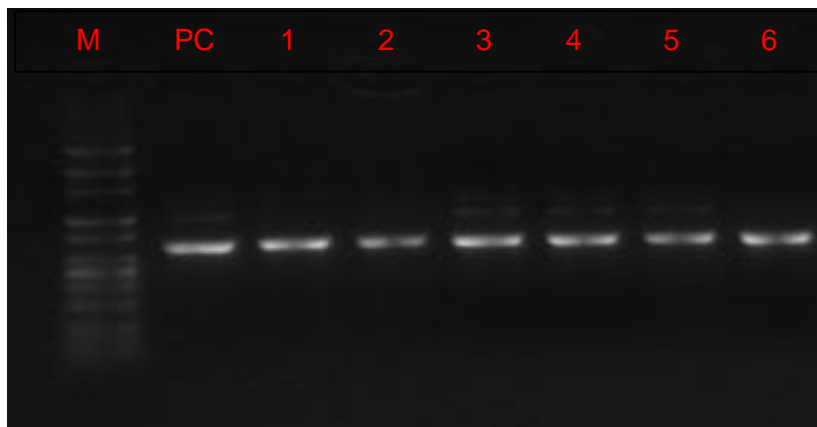
3.2.3 Ενίσχυση με PCR γονιδίων *recA*, *glnII* και *atpD* για τα YP βακτηριακά στελέχη

Πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με σκοπό να ενισχυθούν οι περιοχές των γονιδίων *recA*, *glnII*, και *atpD*, τα ενισχυμένα αυτά τμήματα οδηγήθηκαν προς αλληλούχιση για τον περαιτέρω φυλλογενετικό χαρακτηρισμό των απομονωμένων στελεχών .

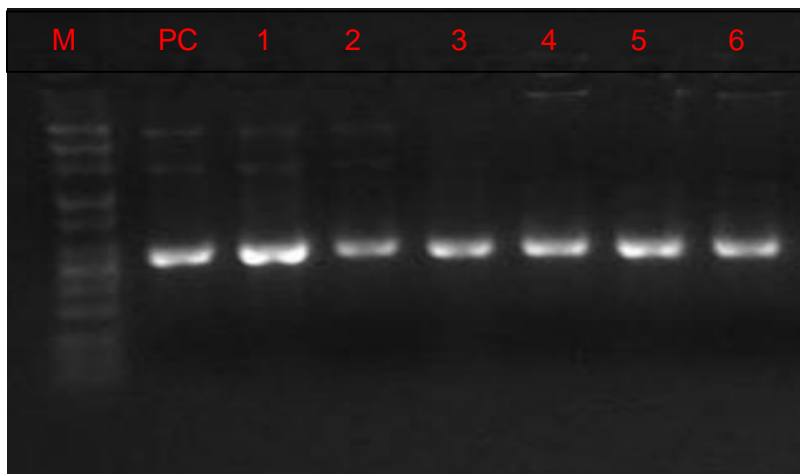
Τα αποτελέσματα της PCR μετά την ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης φαίνονται παρακάτω:



Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης των ενισχυμένων μέσω PCR γονιδίων *recA* των YP βακτηριακών στελεχών. (90V – 40min) Από κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν 2μl για ηλεκτροφόρηση σε 2% (w/v) πηκτή αγαρόζης. Όπου M: Μάρτυρας – Midrange 100bp – 3Kbp DNA Ladder, PC: Θετικός μάρτυρας *Mesorhizobium loti* HAMBI, Κατά σειρά από 1 έως 6: Y.P 1.2.2, Y.P 1.3.1, Y.P 2.2.2 , Y.P 3.6.4, Y.P 4.1.2, Y.P 5.3.3 Y.P 5.4.3 .



Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης των ενισχυμένων μέσω PCR γονιδίων *glnII* των YP βακτηριακών στελεχών. (90V – 40min) Από κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν 2μl για ηλεκτροφόρηση σε 2% (w/v) πηκτή αγαρόζης. Όπου M: Μάρτυρας – Midrange 100bp – 3Kbp DNA Ladder, PC: Θετικός μάρτυρας *Mesorhizobium loti* HAMBI, Κατά σειρά από 1 έως 6: Y.P 1.2.2, Y.P 1.3.1, Y.P 2.2.2 , Y.P 3.6.4, Y.P 4.1.2, Y.P 5.3.3 Y.P 5.4.3 .

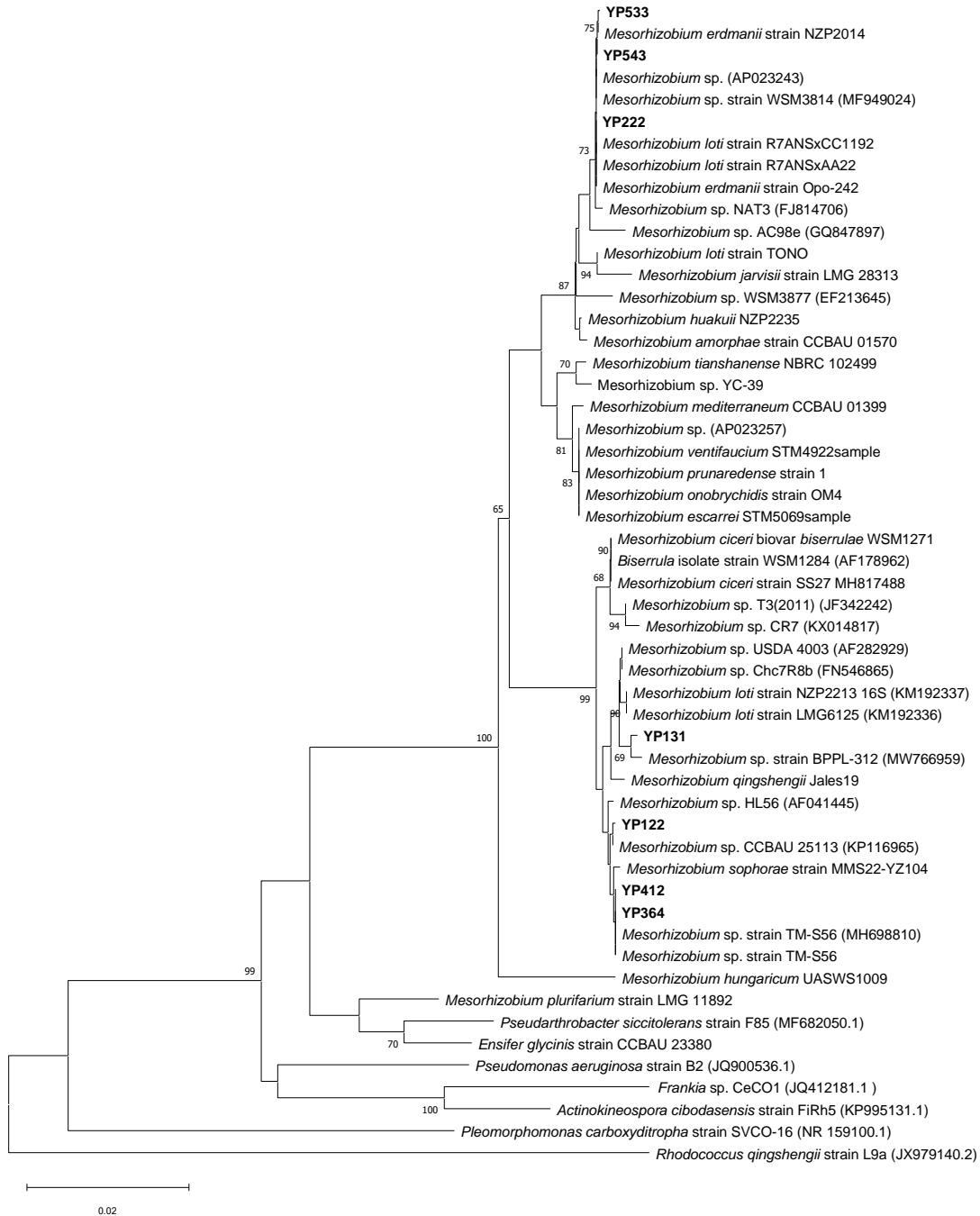


Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης των ενισχυμένων μέσω PCR γονιδίων *atpD* των YP βακτηριακών στελεχών. (90V – 40min) Από κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν 2μl για ηλεκτροφόρηση σε 2% (w/v) πηκτή αγαρόζης. Όπου M: Μάρτυρας – Midrange 100bp – 3Kbp DNA Ladder, PC: Θετικός μάρτυρας *Mesorhizobium loti* HAMBI, Κατά σειρά από 1 έως 6: Y.P 1.2.2, Y.P 1.3.1, Y.P 2.2.2 , Y.P 3.6.4, Y.P 4.1.2, Y.P 5.3.3 Y.P 5.4.3 .

Η ενίσχυση των γονιδιακών τμημάτων με την τεχνολογία αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης ήταν επιτυχής για όλα τα μελετώμενα στελέχη και όλα τα γονιδιακά τμήματα.

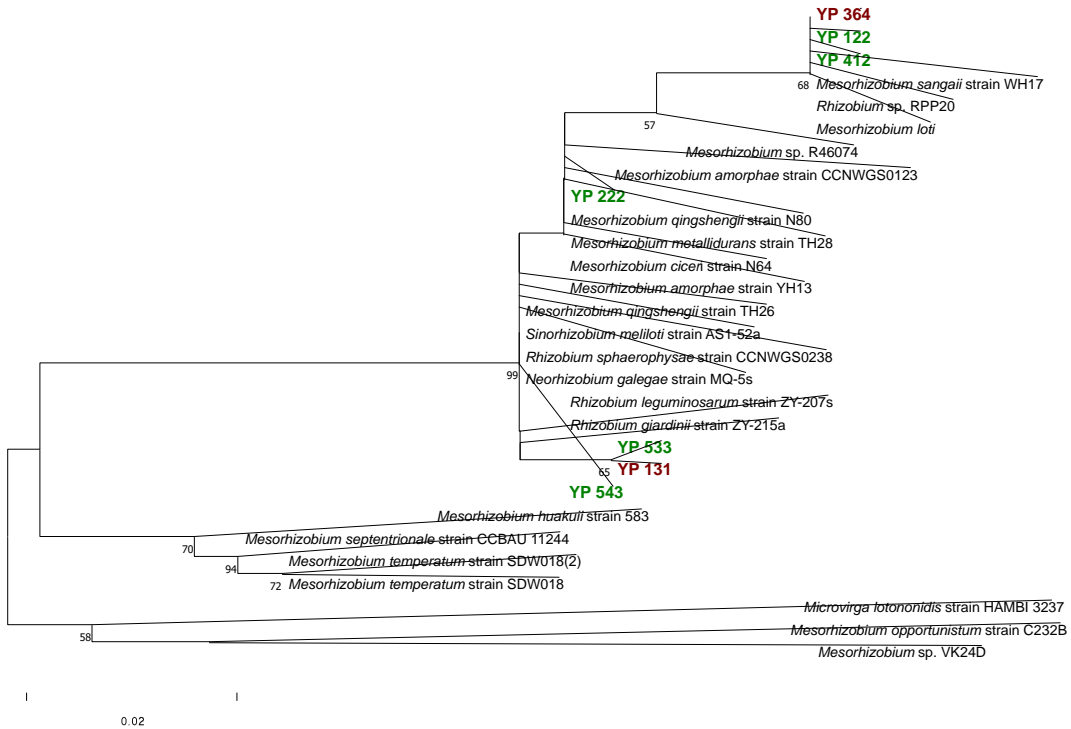
3.3 Φυλογενετικά δένδρα

Τα αποτελέσματα των PCR στάλθηκαν για αλληλούχιση και βάσει της αλληλούχισης πραγματοποιήθηκε η φυλογενετική ανάλυση των στελεχών αυτών. Από αυτή προέκυψε πως τα στελέχη ενδιαφέροντος που μελετήθηκαν ανήκουν όντως στα α-προτεοβακτήρια και συγκεκριμένα στα *Mesorhizobium*. Πραγματοποιήθηκε φυλογενετική ανάλυση τόσο για τα 16s ριβοσωμικά γονίδια, για τα *nodA* & *nifH* πλασμιδιακά γονίδια, όσο και για τα *glnII*, *atpD* και *recA* χρωμοσωμικά γονίδια. Με χρήση του δένδρου 16s μπορούμε να αποφανθούμε για το γένος που ανήκουν τα στελέχη ενδιαφέροντος μας ενώ με συνδυαστική χρήση του *nifH* & *nodA* δένδρου ελέγχεται πόσο κοντινά εξελικτικά είναι τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για την αζωτοδέσμευση. Παρατηρούμε πως τα στελέχη Y.P. 5.3.3 , Y.P. 5.4.3 είναι πολύ συγγενικά , δεδομένου ότι έχουν παρθεί από το ίδιο φυτό δεν αποκαλεί έκπληξη, όμως εξίσου κοντά στο φυλογενετικό δένδρο με αυτά τα δύο στελέχη είναι και το στέλεχος Y.P. 2.2.2. Τα στελέχη αυτά να σημειωθεί πως είχαν και παρόμοια αντίδραση στην καταπόνηση αλατότητας. Παράλληλα βλέπουμε πως τα στελέχη Y.P. 4.1.2 και Y.P. 3.6.4 ομαδοποιούνται μαζί , και αρκετά κοντά τους είναι και το Y.P. 1.3.1 και Y.P. 1.2.2 τα οποία μεταξύ τους παρουσίασαν διαφορετική απόκριση στην καταπόνηση με αλατότητα. Το Y.P. 3.6.4 ήταν αρκετά ευαίσθητο ενώ το Y.P. 4.1.2 ανεκτικό στην καταπόνηση αλατότητας, παράλληλα τα Y.P. 1.2.2 ήταν σχετικά ανεκτικό στο στρες αλατότητας αναπτύχθηκε δηλαδή επαρκώς στα τρυβλία με YMA + 0.5 % NaCl καθώς και στις υγρές καλλιέργειες και το YP 1.3.1 ήταν ανεκτικό σε χαμηλές συγκεντρώσεις NaCl μέχρι 0.5% στην υγρή καλλιέργεια και μέχρι 0.5% στην στερεή. Έχουν όμως και διαφορετικούς ρυθμούς ανάπτυξης (το YP 1.3.1 αναπτύσσεται βραδύτερα από τα άλλα). Όπως θα φανεί και στην συνέχεια στην γονιδιωματική σύγκριση καθώς και την σύγκριση των *in silico* προβλεπόμενων πρωτεϊνών τα Y.P 4.1.2 & Y.P. 3.6.4 παρουσιάζουν λίγες μεν αλλά ουσιαστικές διαφορές.



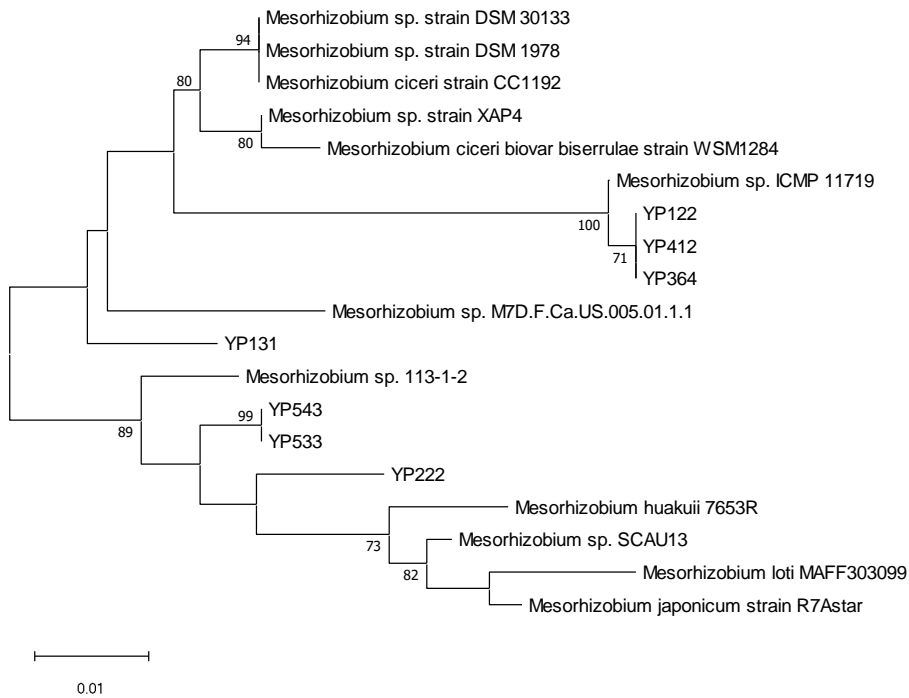
Εικόνα 3.3.1 Φυλογενετικό δένδρο για το γονίδιο 16S.

Από το φυλογενετικό δένδρο για το 16S ριβοσομικό τμήμα που ενισχύθηκε και αλληλουχήθηκε προκύπτει πως όλα τα μελετώμενα στελέχη ανήκουν στο γένος *Mesorhizobium*. Τα στελέχη Y.P.1.3.1 και Y.P.1.2.2 τοπολογικά εμφανίζονται πολύ συγγενικά. Το ίδιο ισχύει για τα στελέχη Y.P.5.3.3; Y.P.5.4.3 και Y.P.2.2.2 όπως και τα Y.P.3.6.4 με το Y.P.4.1.2.



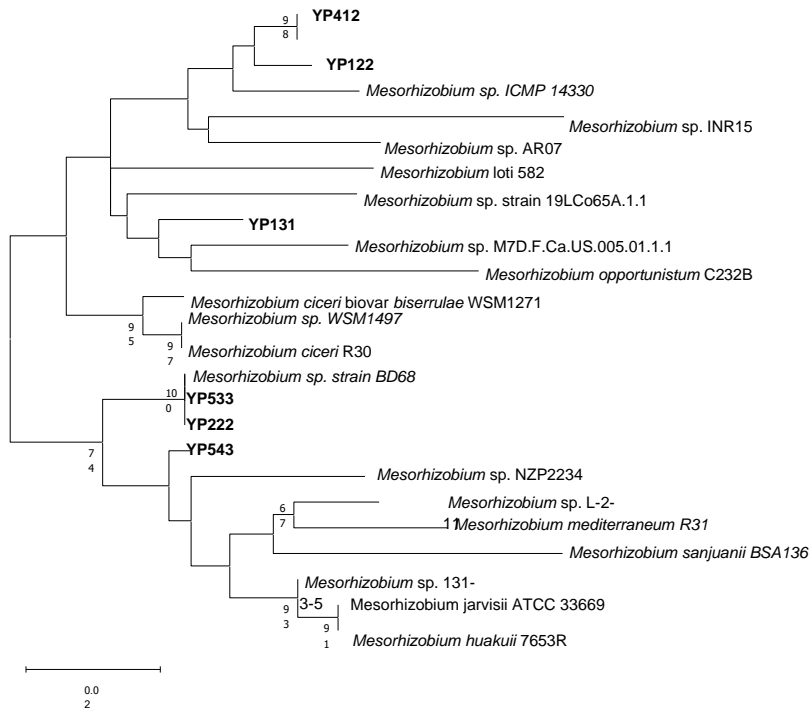
Εικόνα 3.3.2 Φυλογενετικό δένδρο για το γονίδιο *nifH*.

Η τοπολογία του δένδρου για το *nifH* γονίδιο δεν είναι σε πλήρη συμφωνία με αυτή για το 16S. Τα στελέχη Y.P.1.2.2, Y.P.3.6.4 και Y.P.4.1.2 ομαδοποιούνται μαζί όπως και στο δένδρο για τα 16S rRNA, αν υπήρχε ίδια τοπολογία μεταξύ των δένδρων θα παρατηρούσαμε ομαδοποίηση και του στελέχους YP 1.3.1 μαζί με τα Y.P.1.2.2, Y.P.3.6.4. και Y.P.4.1.2. Όμως όπως φαίνεται το στέλεχος Y.P.1.3.1 ομαδοποιείται με το Y.P.5.3.3 στον ίδιο κλάδο, με μεγάλη μεταξύ τους συγγένεια δηλαδή, καθώς κατ' επέκταση και με τα Y.P.2.2.2 και Y.P.5.4.3. Αυτή η διαφορά δεν αποτελεί έκπληξη όπως θα συζητηθεί στην συνέχεια.



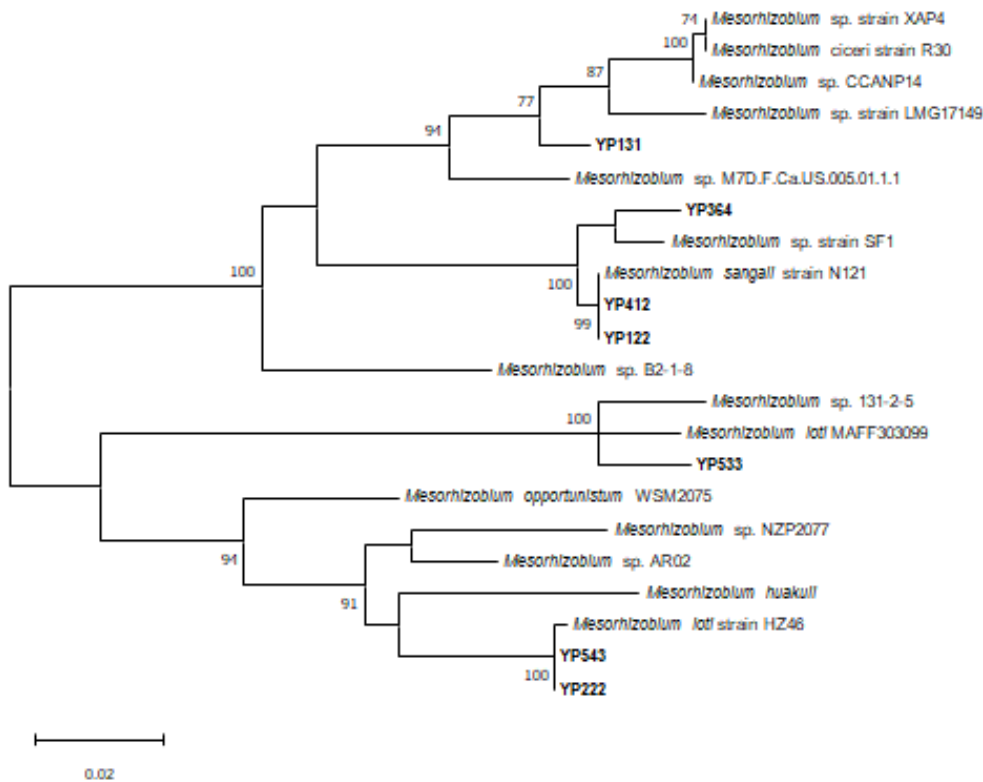
Εικ 3.3.3 Φυλογενετικό δένδρο με βάση το γονίδιο *atpD*

Παρατηρείται πως η τοπολογία του δένδρου για το *atpD* γονίδιο είναι αρκετά πανομοιότυπη με αυτή του φυλογενετικού δένδρου για το 16S ριβοσωμικό τμήμα που αλληλουχίστηκε. Αυτό συμβαίνει διότι πρόκειται για χρωμοσωμικό γονίδιο, αρκετά συντηρημένο.



Εικ 3.3.4 Φυλογενετικό δένδρο με βάση το γονίδιο *recA*

Παρατηρείται πως για το γονίδιο *recA* η τοπολογία του δένδρου συνεχίζει να ακολουθεί το ίδιο μοτίβο, όσον αφορά τα προς μελέτη στελέχη. Με εξαίρεση το στέλεχος Y.P.1.3.1 το οποίο δεν ομαδοποιείται τόσο ισχυρά με τα Y.P.5.3.3 και Y.P.5.4.3. Αυτό συμβαίνει διότι πρόκειται για χρωμοσωμικό γονίδιο, αρκετά συντηρημένο. Δεδομένα που ισχυροποιούν τα μέχρι στιγμής φυλογενετικά συμπεράσματα που προέκυψαν.



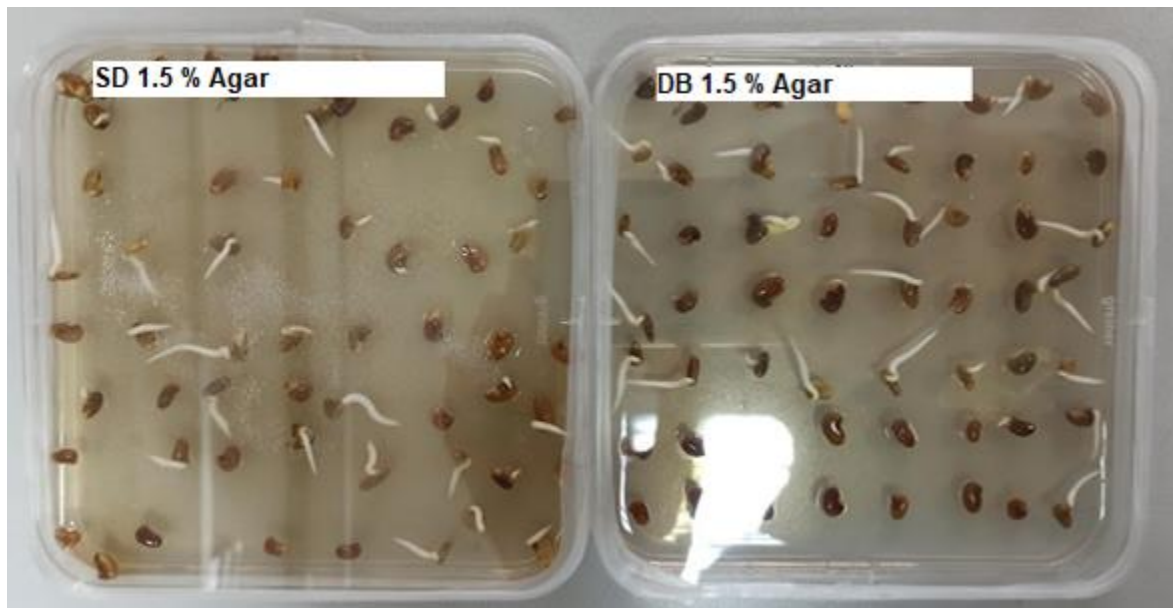
Εικ. 3.3.5 Φυλογενετικό δένδρο με βάση το γονίδιο *glnII*

Για το γονίδιο *glnII* προκύπτει μια μικρή φυλογενετική διαφοροποίηση, παρότι πρόκειται για συντηρημένο χρωμοσωμικό γονίδιο. Πιο συγκεκριμένα από το φυλογενετικό δένδρο φαίνεται πως παρότι αρκετά κοντά εξελικτικά δεν ομαδοποιούνται στον ίδιο κλάδο τα στελέχη Y.P.5.4.3 & Y.P.2.2 μαζί με το Y.P.5.3.3. Όπως και στο συγκεκριμένο δένδρο το στέλεχος Y.P.1.3.1 πάλι φαίνεται να είναι το πιο μακρινό εξελικτικά. Παρόλα αυτά τοποθετούνται σε πολύ συγγενικούς κλάδους.

3.4 Βλάστηση σπόρων και ανάπτυξη φυταρίων

3.4.1 Βλάστηση σπόρων

Μετά τον τραυματισμό και την επιφανειακή αποστείρωση των σπόρων των δύο οικοτύπων DB και SD, παρατηρήθηκε η βλάστηση αυτών.



Εικόνα 3.4.1 βλαστημένα σπέρματα των δύο οικοτύπων αριστερά οικοτύπος SD και δεξιά οικοτύπος DB

Παρατηρείται πως η βλάστηση των σπερμάτων ήταν επιτυχής και για τους δύο οικοτύπους σε επαρκές ποσοστό αυτών.

3.4.2 Ανάπτυξη των νεαρών φυτών και εφαρμογή βακτηριακών στελεχών σε αυτά

Τα βλαστημένα σπέρματα φυτέφθηκαν και μολύνθηκαν με τα αντίστοιχα στελέχη όπως φαίνεται παρακάτω. Υπήρχαν ποικίλοι φαινότυποι όσον αφορά την ανάπτυξη των φυταρίων, απευθείας ανάλογοι της εκάστοτε μόλυνσης. Καθώς και διαφορές μεταξύ των δύο οικοτύπων. Δέκα φυτάρια του εκάστοτε οικοτύπου εμβολιάστηκαν αντίστοιχα με κάθε διαφορετικό απομονωμένο βακτηριακό στέλεχος. Σαν αρνητικός δείκτης (negative control) χρησιμοποιήθηκαν φυτάρια που δεν μολύνθηκαν με κάποιο βακτήριο ενώ παράλληλα ποτιζόντουσαν με πλήρες όσον αφορά το Αζωτο θρεπτικό.



Εικόνα 3.4.2 Νεαρά *Robinia pseudoacacia* εμβολιασμένα με τα μελετώμενα στελέχη

Φυτάρια 45 ημερών *Robinia pseudoacacia* εμβολιασμένα με τα μελετώμενα στελέχη. Ανεπτυγμένα σε συνθήκες αζωτοπενίας Από αριστερά προς τα δεξιά:
 Control φυτάρια χωρίς εμβολιασμό με βακτήρια (ανεπτυγμένα με χρήση θρεπτικού πλήρους σε άζωτο (+N));
 Y.P.1.2.2. ; Y.P.1.3.1 ; Y.P.2.2.2 ; Y.P.3.6.4. ; Y.P.5.3.3 ; Y.P. 5.4.3 ; HAMBI Όπου Y.P.X.X.X το στέλεχος εμβολιασμού.

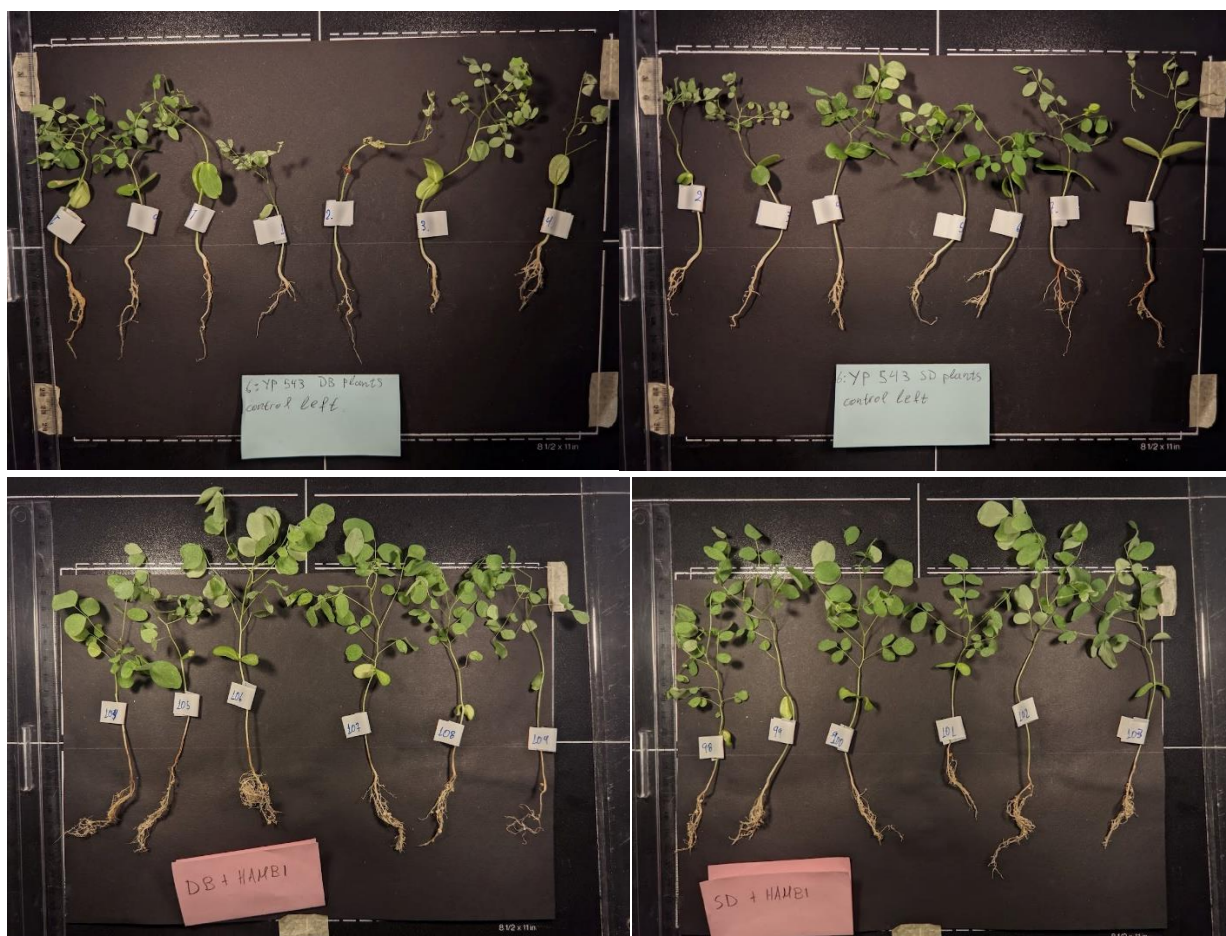
Σημείωση: τα φυτάρια εμβολιασμένα με το Y.P.4.1.2 αναπτύχθηκαν σε διαφορετικό χώρο με ίδιες περιβαλλοντικές συνθήκες. Καθώς το συγκεκριμένο στέλεχος φάνηκε ιδιαίτερα ανταγωνιστικό.

3.5 Βιομετρία

Μετά το πέρας 45 ημερών ανάπτυξης μετά τη βλάστηση σε συνθήκες έλλειψης αζώτου παρουσία των συμβιωτικών στελεχών. Τα φυτά της *Robinia pseudoacacia* αφαιρέθηκαν από τα δοχεία ανάπτυξης και μετρήθηκαν αρκετά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά τους. Παρακάτω φαίνονται τα φυτά του κάθε οικότυπου που έχουν αλληλοεπιδράσει με το εκάστοτε βακτηριακό στέλεχος.







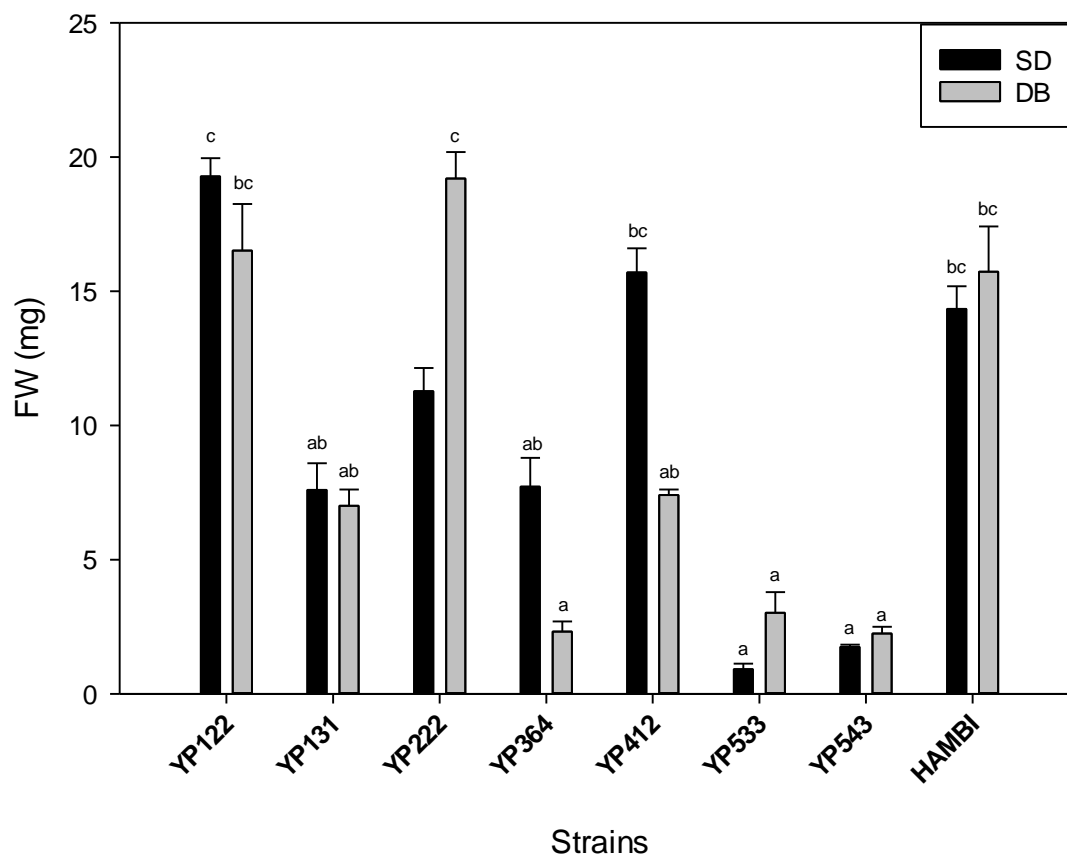
Φυτάρια 45 ημερών *Robinia pseudoacacia* εμβολιασμένα με τα μελετώμενα στελέχη. Ανεπτυγμένα σε συνθήκες αζωτοπενίας Από αριστερά προς τα δεξιά:

οικότυπος DB με Y.P.1.2.2; SD Y.P.1.2.2; DB Y.P.1.3.1; SD Y.P.1.3.1; DB Y.P.2.2.2; SD Y.P.2.2.2; DB Y.P.3.6.4; SD Y.P.3.6.4; DB Y.P.4.1.2; SD Y.P.4.1.2; DB Y.P.5.3.3; SD Y.P.5.3.3; DB Y.P.5.4.3; SD Y.P.5.4.3; DB HAMBI; SD HAMBI

Όπου SD και DB ο εκάστοτε οικότυπος και Y.P.X.X.X το στέλεχος εμβολιασμού.

Μετρήθηκε το ενυδατωμένο (Nodule Fresh Weight(FW)) καθώς και το ξηρό βάρος (Nodule Dry Weight (DW)) των φυματιών που δομήθηκαν μέσω της αλληλεπίδρασης των φυταρίων και των απομονωμένων στελεχών. Για την διαδικασία της ξήρανσης τα φυμάτια τοποθετήθηκαν στους 37 βαθμούς για 48 ώρες. Χρησιμοποιήθηκε ζυγός ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων Pioneer™ OHAUS (United States). Τα δεδομένα της μέτρησης παρατίθενται παρακάτω. Όπου Fresh weight ενυδατωμένη μάζα και DW αφυδατωμένη μάζα.

Nodule Fresh Weight



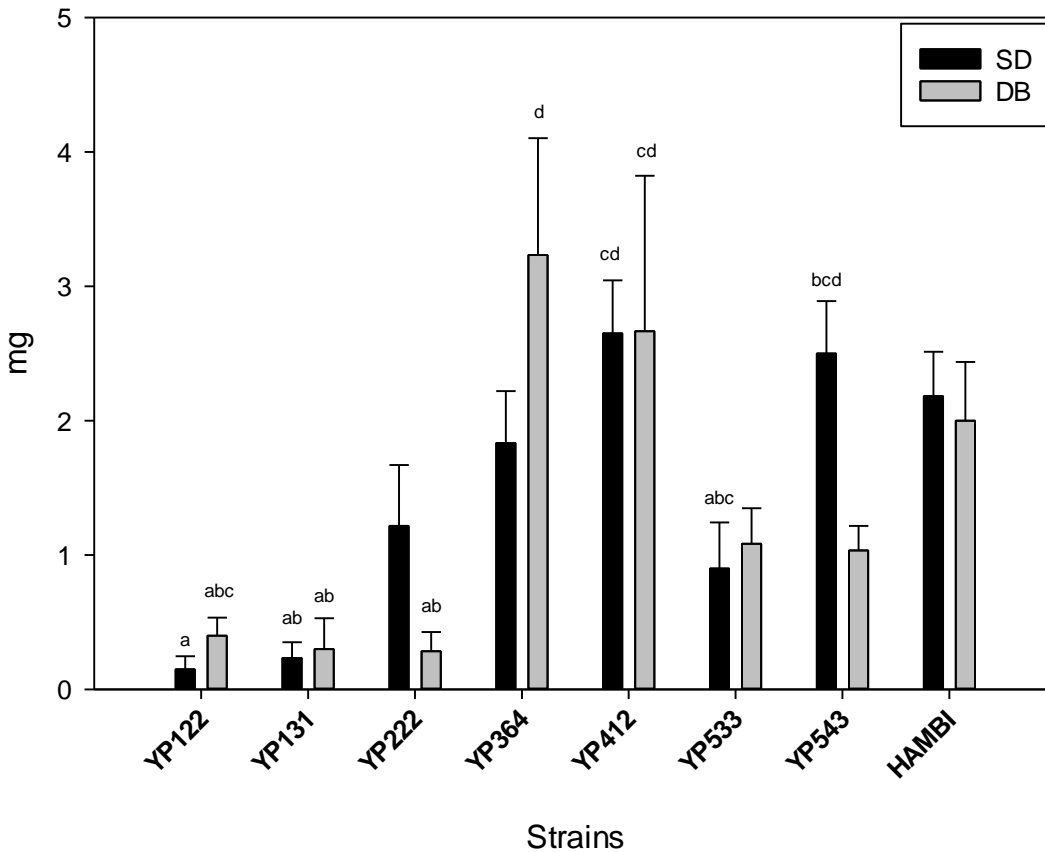
Ενυδατωμένη μάζα φυματίων (nodules) από φυτάρια 45 ημερών *Robinia pseudoacacia* εμβολιασμένα με τα μελετώμενα στελέχη. Ανεπτυγμένα σε συνθήκες αζωτοπενίας. Από αριστερά προς τα δεξιά: οικότυπος με SD Y.P.1.2.2; DB Y.P.1.2.2; SD Y.P.1.3.1; DB Y.P.1.3.1; SD Y.P.2.2.2; DB Y.P.2.2.2; SD Y.P.3.6.4; DB Y.P.3.6.4; SD Y.P.4.1.2; DB Y.P.4.1.2; SD Y.P.5.3.3; DB Y.P.5.3.3; SD Y.P.5.4.3; DB Y.P.5.4.3; SD HAMBI; DB HAMBI

Όπου SD και DB ο εκάστοτε οικότυπος και Y.P.X.X.X το στέλεχος εμβολιασμού.

Για τον υπολογισμό των σφαλμάτων και την στατιστική σημαντικότητα των μετρήσεων έγινε two way ANOVA ($p < 0.05$).

Παρατηρείται πως κατά πλειοψηφία τα φυτάρια του οικότυπου SD δομούν μεγαλύτερα φυμάτια από τα φυτάρια του οικότυπου DB όταν και οι δύο οικότυποι αυτοί εμβολιάζονται με τα μελετώμενα στελέχη, σε συνθήκες αζωτοπενίας όπως περιεγράφηκαν ανωτέρω. Με εμβολιασμό ορισμένων στελεχών (Y.P.1.3.1; Y.P.5.3.3; Y.P.5.4.3. HAMBI) δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μεταβολή της ενυδατωμένης μάζας των σχηματιζόμενων φυματίων. Μοναδική εξαίρεση φαίνεται να προκύπτει στην περίπτωση που το στέλεχος εμβολιασμού είναι το Y.P.2.2.2.

Nodule DW



Ξηρή μάζα φυματίων (nodules) από φυτάρια 45 ημερών *Robinia pseudoacacia* εμβολιασμένα με τα μελετώμενα στελέχη. Ανεπτυγμένα σε συνθήκες αζωτοπενίας. Από αριστερά προς τα δεξιά:

οικότυπος με SD Y.P.1.2.2; DB Y.P.1.2.2; SD Y.P.1.3.1; DB Y.P.1.3.1; SD Y.P.2.2.2; DB Y.P.2.2.2; SD Y.P.3.6.4; DB Y.P.3.6.4; SD Y.P.4.1.2; DB Y.P.4.1.2; SD Y.P.5.3.3; DB Y.P.5.3.3; SD Y.P.5.4.3; DB Y.P.5.4.3; SD HAMBI; DB HAMBI

Όπου SD και DB ο εκάστοτε οικότυπος και Y.P.X.X.X το στέλεχος εμβολιασμού.

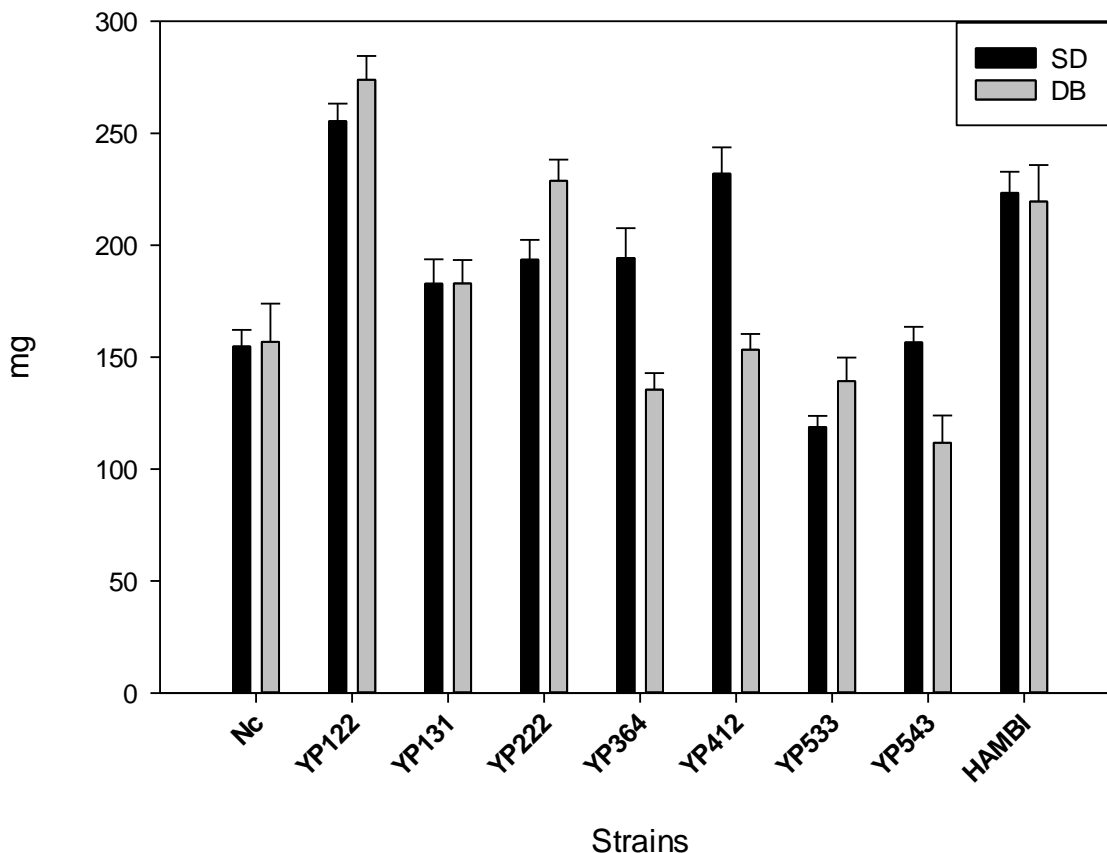
Για τον υπολογισμό των σφαλμάτων και την στατιστική σημαντικότητα των μετρήσεων έγινε two way ANOVA ($p < 0.05$).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα αφυδατωμένα φυμάτια των Y.P.1.2.2; Y.P.1.3.1; και Y.P.2.2.2 έχουν αναλογικά πολύ μειωμένο βάρος σε σχέση με τα φυμάτια των υπολοίπων στελεχών. Ενώ τα φυμάτια των Y.P.5.3.3 & Y.P.5.4.3 μετά την ξήρανση δεν παρουσιάζουν ιδιαίτερη μεταβολή βάρους.

Ζυγίσθηκε επίσης η ενυδατωμένη μάζα των φύλων(Leaf), του βλαστού (Stem) και των ριζών(Root) των φυταρίων της ροβίνιας.

Τα φύλα με το βλαστό ζυγίσθηκαν χωριστά από τις ρίζες και οι μετρήσεις αθροίσθηκαν για τον υπολογισμό της ολικής μάζας (Total Plant Weight).

Leaf and Stem weight



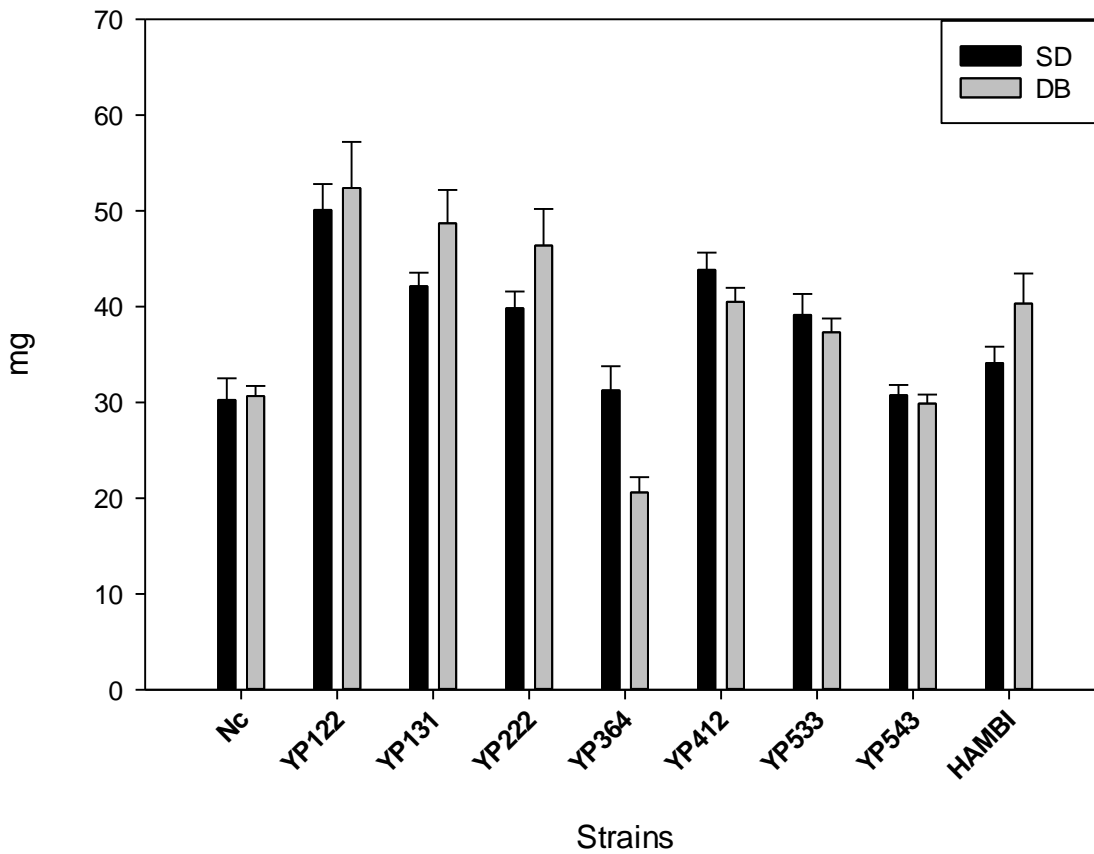
Ενυδατωμένη μάζα φύλων και βλαστού (leaf and stem) από φυτάρια 45 ημερών *Robinia pseudoacacia* εμβολιασμένα με τα μελετώμενα στελέχη. Ανεπτυγμένα σε συνθήκες αζωτοπενίας. Από αριστερά προς τα δεξιά:

NC (αρνητικός δείκτης) SD Y.P.1.2.2; DB Y.P.1.2.2; SD Y.P.1.3.1; DB Y.P.1.3.1; SD Y.P.2.2.2; DB Y.P.2.2.2; SD Y.P.3.6.4; DB Y.P.3.6.4; SD Y.P.4.1.2; DB Y.P.4.1.2; SD Y.P.5.3.3; DB Y.P.5.3.3; SD Y.P.5.4.3; DB Y.P.5.4.3; SD HAMB1; DB HAMB1

Όπου SD και DB ο εκάστοτε οικότυπος και Y.P.X.X.X το στέλεχος εμβολιασμού.

Σαν αρνητικός δείκτης χρησιμοποιήθηκε φυτάριο χωρίς ένεση συμβιωτικού στελέχους μεγαλωμένο με θρεπτικό πλήρους περιεκτικότητας αζώτου. Για τον υπολογισμό των σφαλμάτων και την στατιστική σημαντικότητα των μετρήσεων έγινε two way ANOVA ($p < 0.05$).

Root weight



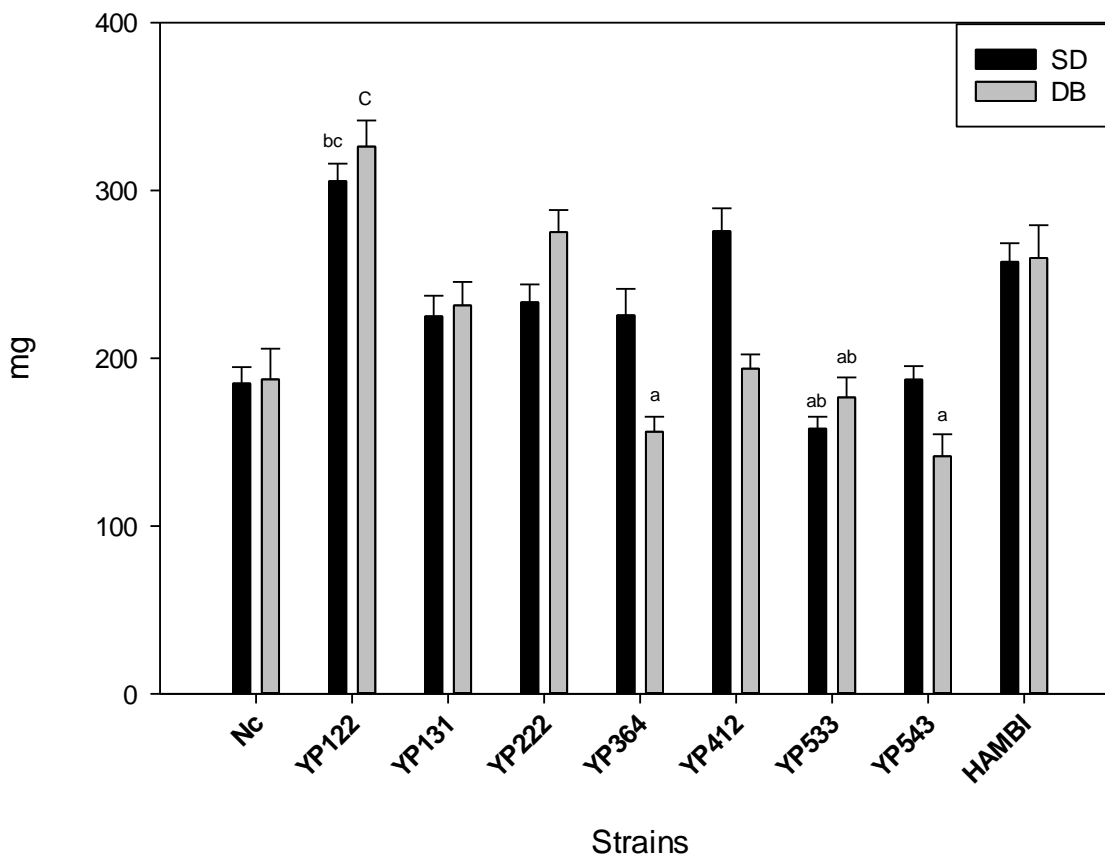
Ενυδατωμένη μάζα ριζών (root) από φυτάρια 45 ημερών *Robinia pseudoacacia* εμβολιασμένα με τα μελετώμενα στελέχη. Ανεπτυγμένα σε συνθήκες αζωτοπενίας. Από αριστερά προς τα δεξιά:

NC (αρνητικός δείκτης) SD Y.P.1.2.2; DB Y.P.1.2.2; SD Y.P.1.3.1; DB Y.P.1.3.1; SD Y.P.2.2.2; DB Y.P.2.2.2; SD Y.P.3.6.4; DB Y.P.3.6.4; SD Y.P.4.1.2; DB Y.P.4.1.2; SD Y.P.5.3.3; DB Y.P.5.3.3; SD Y.P.5.4.3; DB Y.P.5.4.3; SD HAMBI; DB HAMBI

Όπου SD και DB ο εκάστοτε οικότυπος και Y.P.X.X.X το στέλεχος εμβολιασμού.

Σαν αρνητικός δείκτης χρησιμοποιήθηκε φυτάριο χωρίς ένεση συμβιωτικού στελέχους μεγαλωμένο με θρεπτικό πλήρους περιεκτικότητας αζώτου. Για τον υπολογισμό των σφαλμάτων και την στατιστική σημαντικότητα των μετρήσεων έγινε two way ANOVA ($p < 0.05$).

Total plant weight



Ενυδατωμένη μάζα ολόκληρου του φυτού (total plant) από φυτάρια 45 ημερών *Robinia pseudoacacia* εμβολιασμένα με τα μελετώμενα στελέχη. Ανεπτυγμένα σε συνθήκες αζωτοπενίας. Από αριστερά προς τα δεξιά:

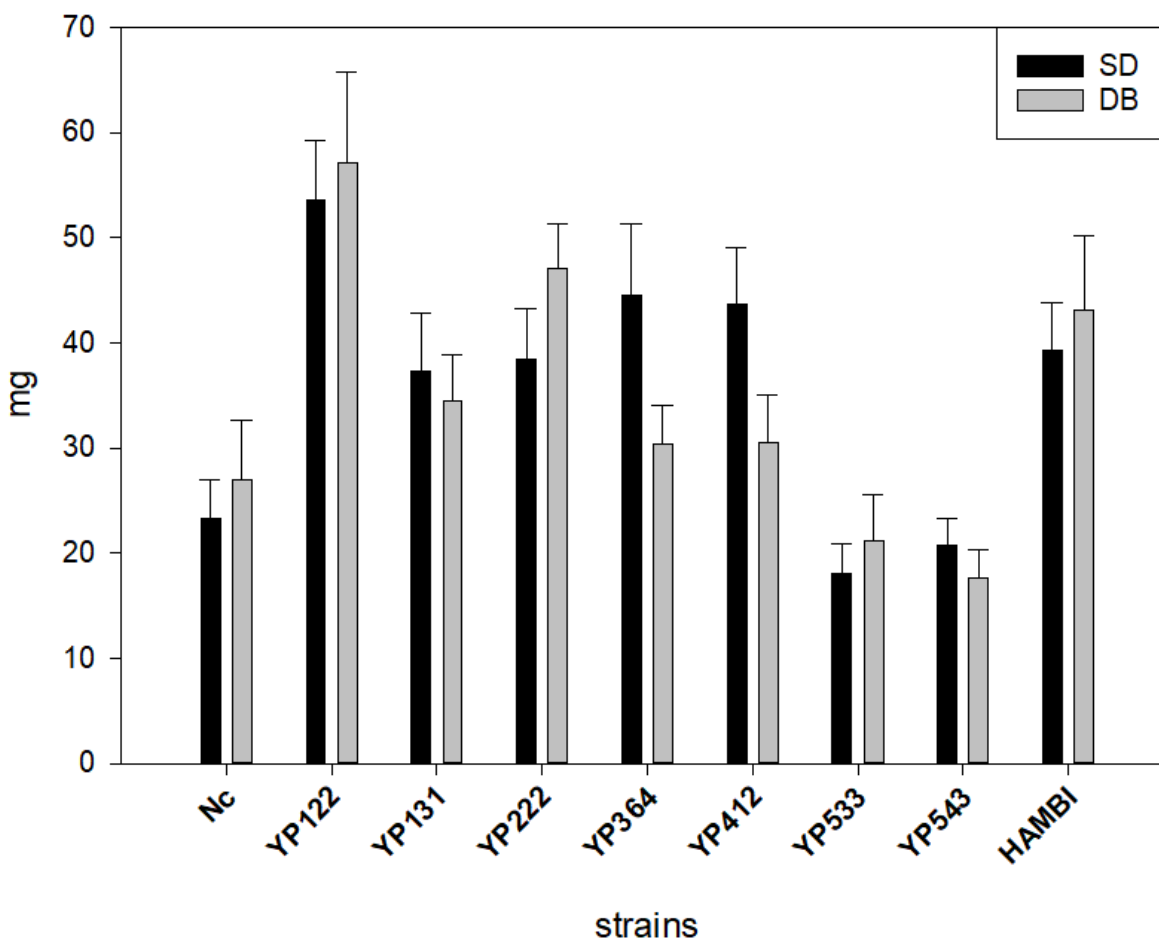
NC (αρνητικός δείκτης) SD Y.P.1.2.2; DB Y.P.1.2.2; SD Y.P.1.3.1; DB Y.P.1.3.1; SD Y.P.2.2.2; DB Y.P.2.2.2; SD Y.P.3.6.4; DB Y.P.3.6.4; SD Y.P.4.1.2; DB Y.P.4.1.2; SD Y.P.5.3.3; DB Y.P.5.3.3; SD Y.P.5.4.3; DB Y.P.5.4.3; SD HAMBI; DB HAMBI

Όπου SD και DB ο εκάστοτε οικοτύπος και Y.P.X.X.X το στέλεχος εμβολιασμού.

Σαν αρνητικός δείκτης χρησιμοποιήθηκε φυτάριο χωρίς ένεση συμβιωτικού στελέχους μεγαλωμένο με θρεπτικό πλήρους περιεκτικότητας αζώτου. Για τον υπολογισμό των σφαλμάτων και την στατιστική σημαντικότητα των μετρήσεων έγινε two way ANOVA ($p < 0.05$).

Παρατηρείται πως όσον αφορά τα μελετώμενα στελέχη εμβολιασμού όσο και τους οικοτύπους της ροβίνιας. Τα φυτάρια που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος Y.P.2.2.2 είχαν την μεγαλύτερη ενυδατωμένη μάζα ενώ αυτά που εμβολιάστηκαν με τα Y.P.5.4.3 και Y.P.5.3.3 την μικρότερη ανεξαρτήτως οικοτύπου. Παράλληλα φαίνεται πως τα φυτάρια DB του εμβολιάστηκαν με το Y.P.3.6.4 είχαν μικρότερη απόδοση υγρής μάζας από τον οικοτύπο SD εμβολιασμένο με το ίδιο στέλεχος

Total plant DW



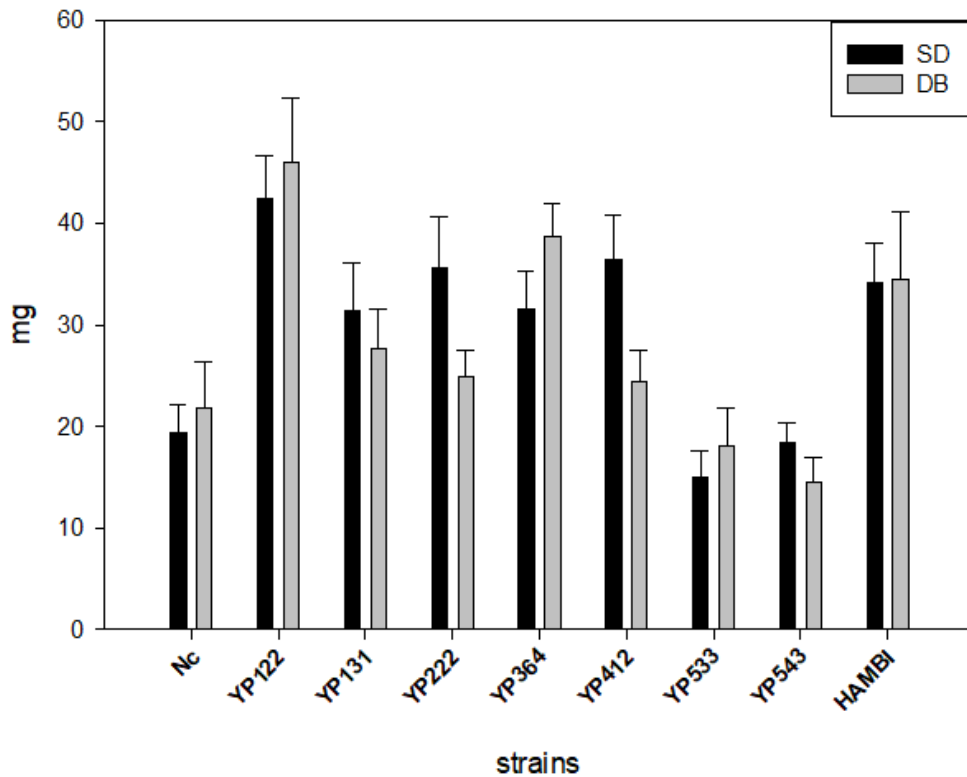
Αποξηραμένη μάζα ολόκληρου του φυτού (total plant DW) από φυτάρια 45 ημερών *Robinia pseudoacacia* εμβολιασμένα με τα μελετώμενα στελέχη. Ανεπτυγμένα σε συνθήκες αζωτοπενίας. Από αριστερά προς τα δεξιά:

NC (αρνητικός δείκτης) SD Y.P.1.2.2; DB Y.P.1.2.2; SD Y.P.1.3.1; DB Y.P.1.3.1; SD Y.P.2.2.2; DB Y.P.2.2.2; SD Y.P.3.6.4; DB Y.P.3.6.4; SD Y.P.4.1.2; DB Y.P.4.1.2; SD Y.P.5.3.3; DB Y.P.5.3.3; SD Y.P.5.4.3; DB Y.P.5.4.3; SD HAMBI; DB HAMBI

Όπου SD και DB ο εκάστοτε οικότυπος και Y.P.X.X.X το στέλεχος εμβολιασμού.

Σαν αρνητικός δείκτης χρησιμοποιήθηκε φυτάρια χωρίς ένεση συμβιωτικού στελέχους μεγαλωμένο με θρεπτικό πλήρους περιεκτικότητας αζώτου. Για τον υπολογισμό των σφαλμάτων και την στατιστική σημαντικότητα των μετρήσεων έγινε two way ANOVA ($p < 0.05$).

Shoot DW



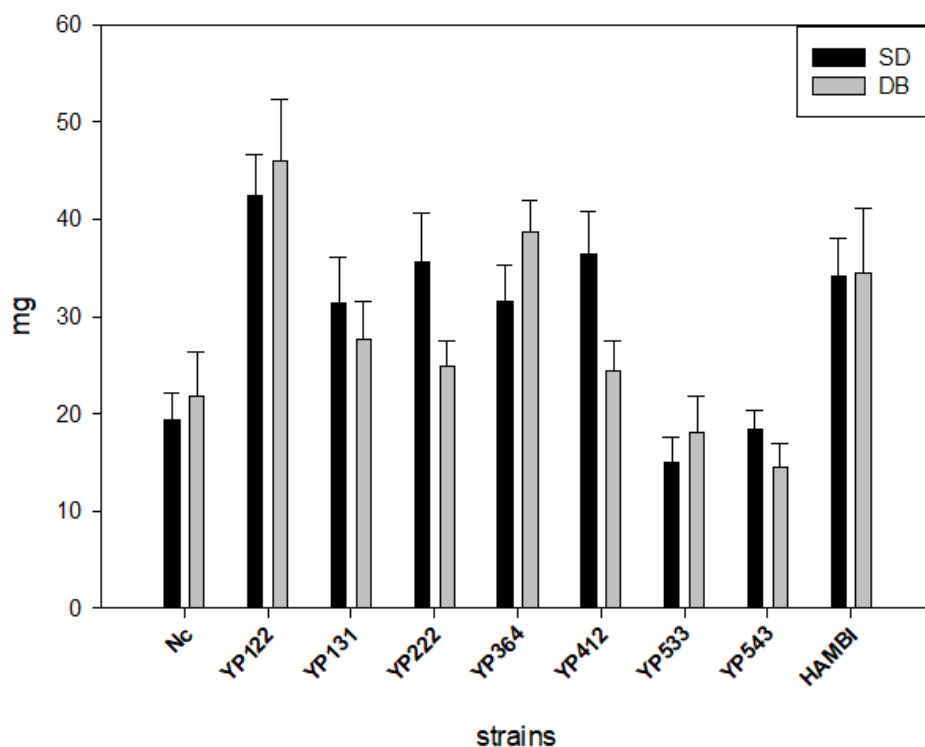
Ξηρή μάζα (DW) φύλων και βλαστού (shoot) από φυτάρια 45 ημερών *Robinia pseudoacacia* εμβολιασμένα με τα μελετώμενα στελέχη. Ανεπτυγμένα σε συνθήκες αζωτοπενίας. Από αριστερά προς τα δεξιά:

NC (αρνητικός δείκτης) SD Y.P.1.2.2; DB Y.P.1.2.2; SD Y.P.1.3.1; DB Y.P.1.3.1; SD Y.P.2.2.2; DB Y.P.2.2.2; SD Y.P.3.6.4; DB Y.P.3.6.4; SD Y.P.4.1.2; DB Y.P.4.1.2; SD Y.P.5.3.3; DB Y.P.5.3.3; SD Y.P.5.4.3; DB Y.P.5.4.3; SD HAMBI; DB HAMBI

Όπου SD και DB ο εκάστοτε οικότυπος και Y.P.X.X.X το στέλεχος εμβολιασμού.

Σαν αρνητικός δείκτης χρησιμοποιήθηκε φυτάριο χωρίς ένεση συμβιωτικού στελέχους μεγαλωμένο με θρεπτικό πλήρους περιεκτικότητας αζώτου. Για τον υπολογισμό των σφαλμάτων και την στατιστική σημαντικότητα των μετρήσεων έγινε two way ANOVA ($p < 0.05$).

Root DW



Μάζα αποξηραμένων ριζών (root DW) από φυτάρια 45 ημερών *Robinia pseudoacacia* εμβολιασμένα με τα μελετώμενα στελέχη. Ανεπτυγμένα σε συνθήκες αζωτοπενίας. Από αριστερά προς τα δεξιά:

NC (αρνητικός δείκτης) SD Y.P.1.2.2; DB Y.P.1.2.2; SD Y.P.1.3.1; DB Y.P.1.3.1; SD Y.P.2.2.2; DB Y.P.2.2.2; SD Y.P.3.6.4; DB Y.P.3.6.4; SD Y.P.4.1.2; DB Y.P.4.1.2; SD Y.P.5.3.3; DB Y.P.5.3.3; SD Y.P.5.4.3; DB Y.P.5.4.3; SD HAMBI; DB HAMBI

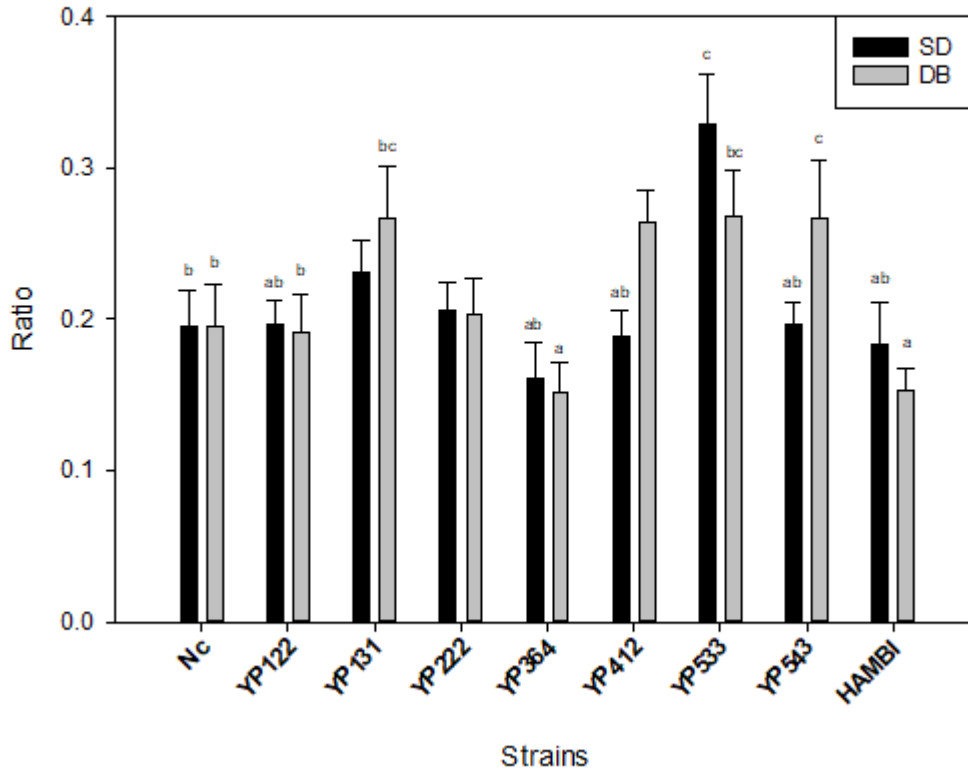
Όπου SD και DB ο εκάστοτε οικότυπος και Y.P.X.X.X το στέλεχος εμβολιασμού.

Σαν αρνητικός δείκτης χρησιμοποιήθηκε φυτάριο χωρίς ένεση συμβιωτικού στελέχους μεγαλωμένο με θρεπτικό πλήρους περιεκτικότητας αζώτου. Για τον υπολογισμό των σφαλμάτων και την στατιστική σημαντικότητα των μετρήσεων έγινε two way ANOVA ($p < 0.05$).

Φαίνεται πως μετά τη διαδικασία ξήρανσης των φυταρίων, η μείωση του βάρους αυτών είναι οριζοντίως ανάλογη.

Υπολογίσθηκε ο λόγος μάζας ριζών προς βλαστών και φύλλων των φυταρίων. Όπως φαίνεται στο παρακάτω γράφημα.

Root/Shoot FW Ratio



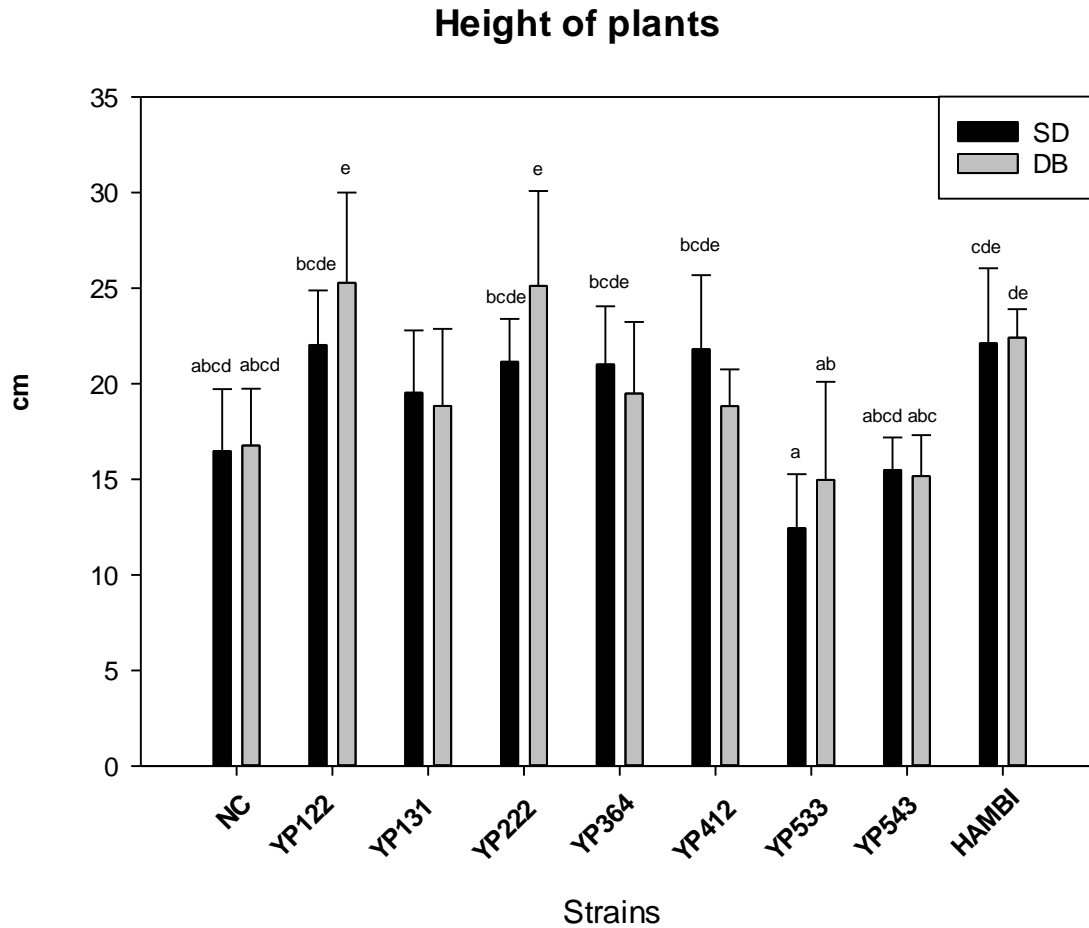
Λόγος ριζών – βλαστού (Root/Shoot) από φυτάρια 45 ημερών *Robinia pseudoacacia* εμβολιασμένα με τα μελετώμενα στελέχη. Ανεπτυγμένα σε συνθήκες αζωτοπενίας. Από αριστερά προς τα δεξιά:

NC (αρνητικός δείκτης) SD Y.P.1.2.2; DB Y.P.1.2.2; SD Y.P.1.3.1; DB Y.P.1.3.1; SD Y.P.2.2.2; DB Y.P.2.2.2; SD Y.P.3.6.4; DB Y.P.3.6.4; SD Y.P.4.1.2; DB Y.P.4.1.2; SD Y.P.5.3.3; DB Y.P.5.3.3; SD Y.P.5.4.3; DB Y.P.5.4.3; SD HAMB1; DB HAMB1
Όπου SD και DB ο εκάστοτε οικότυπος και Y.P.X.X.X το στέλεχος εμβολιασμού.

Σαν αρνητικός δείκτης χρησιμοποιήθηκε φυτάριο χωρίς ένεση συμβιωτικού στελέχους μεγαλωμένο με θρεπτικό πλήρους περιεκτικότητας αζώτου. Για τον υπολογισμό των σφαλμάτων και την στατιστική σημαντικότητα των μετρήσεων έγινε two way ANOVA ($p < 0.05$)

Από το γράφημα του λόγου ριζών – βλαστού προκύπτει πώς τα φυτάρια οικότυπου DB όταν εμβολιάζονται με τα στελέχη Y.P.1.3.1; Y.P.4.1.2 και Y.P.5.4.3 σε συνθήκες αζωτοπενίας αναπτύσσουν μεγαλύτερο ριζικό σύστημα από ότι υπέργειο τμήμα σε σχέση με τα φυτάρια οικότυπου SD όταν εμβολιάζονται με τα ίδια στελέχη σε ίδιες συνθήκες. Αντιθέτως με τον εμβολιασμό με το στέλεχος Y.P.5.3.3 το ριζικό σύστημα του οικότυπου SD είναι πιο ανεπτυγμένο σε σχέση με το υπέργειο τμήμα από το αντίστοιχο του οικότυπου DB. Ακόμα εμβολιασμός με τα στελέχη Y.P.1.2.2; Y.P.2.2.2; Y.P.3.6.4. και HAMB1 φαίνεται να μην οδηγεί σε φαινοτυπικές διαφορές όσον αφορά τον λόγο μάζας ριζικού συστήματος / βλαστού μεταξύ των δυο οικότυπων. Τέλος να σημειωθεί πως τα στελέχη Y.P.1.3.1; Y.P.4.1.2; Y.P.5.3.3 και Y.P.5.4.3 φαίνεται να ενισχύουν την ανάπτυξη ριζικού συστήματος σε συνθήκες αζωτοπενίας ενώ το στέλεχος Y.P.3.6.4 να τη μειώνει.

Μετρήθηκε το ύψος των φυταρίων μόλις ξεριζώθηκαν από το υπόστρωμα ανάπτυξης, οι μετρήσεις φαίνονται στο παρακάτω γράφημα.



Ύψος φυταρίων (Height of plants) 45 ημερών *Robinia pseudoacacia* εμβολιασμένα με τα μελετώμενα στελέχη. Ανεπτυγμένα σε συνθήκες αζωτοπενίας. Από αριστερά προς τα δεξιά:

NC (αρνητικός δείκτης) SD Y.P.1.2.2; DB Y.P.1.2.2; SD Y.P.1.3.1; DB Y.P.1.3.1; SD Y.P.2.2.2; DB Y.P.2.2.2; SD Y.P.3.6.4; DB Y.P.3.6.4; SD Y.P.4.1.2; DB Y.P.4.1.2; SD Y.P.5.3.3; DB Y.P.5.3.3; SD Y.P.5.4.3; DB Y.P.5.4.3; SD HAMBI; DB HAMBI

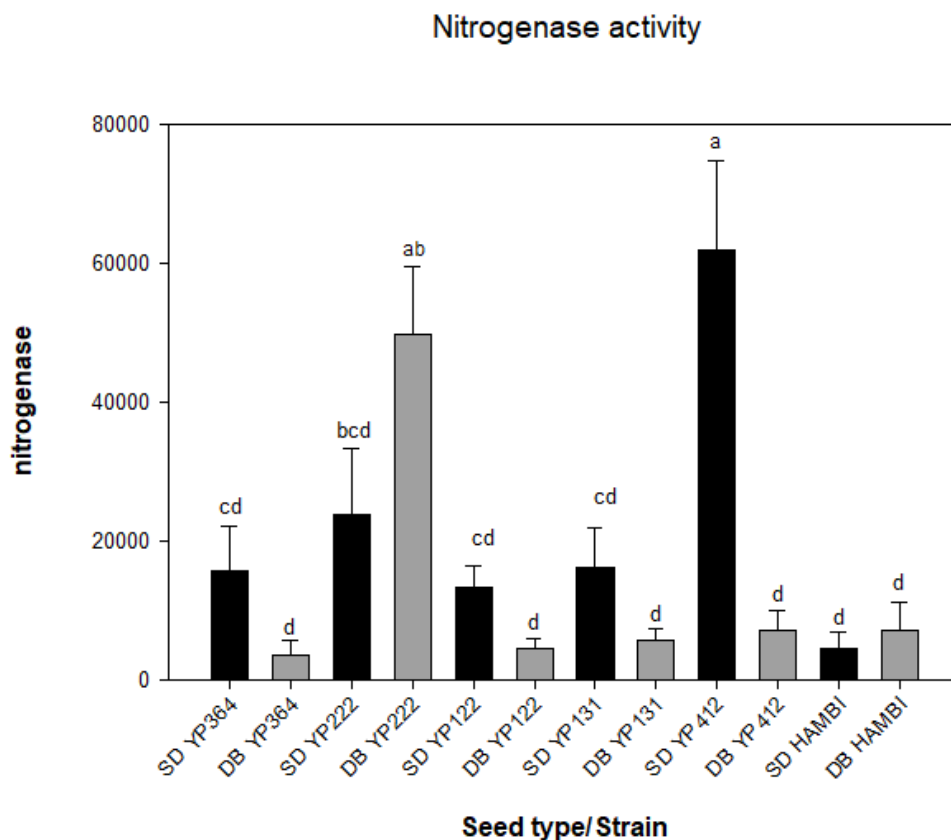
Όπου SD και DB ο εκάστοτε οικότυπος και Y.P.X.X.X το στέλεχος εμβολιασμού.

Σαν αρνητικός δείκτης χρησιμοποιήθηκε φυτάριο χωρίς ένεση συμβιωτικού στελεχούς μεγαλωμένο με θρεπτικό πλήρους περιεκτικότητας αζώτου. Για τον υπολογισμό των σφαλμάτων και την στατιστική σημαντικότητα των μετρήσεων έγινε two way ANOVA ($p < 0.05$).

Όσον αφορά το ολικό ύψος των φυταρίων μετά τις 45 ημέρες ανάπτυξης σε συνθήκες αζωτοπενίας με παράλληλο εμβολιασμό των ριζοβίων στελεχών, προκύπτει πως τα φυτάρια που φτάσαν το μέγιστο ύψος ήταν αυτά του οικότυπου DB που εμβολιάστηκαν με τα στελέχη Y.P.1.2.2 και Y.P.2.2.2. Ενώ το ελάχιστο ύψος παρουσιάστηκε στα φυτάρια οικότυπου SD όταν εμβολιάστηκαν με το στέλεχος Y.P.5.3.3.

3.6 Δραστικότητα Νιτρογενάσης

Η διαδικασία της μέτρησης της δραστικότητας της νιτρογενάσης (nitrogenase activity) πραγματοποιήθηκε όπως περιεγράφηκε προηγουμένως. Παρακάτω παρατίθεται γράφημα με τα αποτελέσματα της μέτρησης. Σαν μηδενικός δείκτης χρησιμοποιήθηκε φυτάριο που αναπτύχθηκε απουσία ριζοβιακού συμβιώτη με πλήρη ποσότητα αζώτου στο θρεπτικό, ούτως ώστε να εξαλειφθούν τυχούσες τιμές που οφείλονται αμιγώς στην βιοχημεία του φυταρίου.



Δραστικότητα της νιτρογενάσης (nitrogenase activity) στον κάθετο άξονα φαίνεται η δραστικότητα της νιτρογενάσης ενώ στον οριζόντιο ο συνδυασμός του κάθε οικοτύπου – βακτηριακού στελέχους.

Από αριστερά προς τα δεξιά:

οικότυπος DB με Y.P.1.2.2; SD Y.P.1.2.2; DB Y.P.1.3.1; SD Y.P.1.3.1; DB Y.P.2.2.2; SD Y.P.2.2.2; DB Y.P.3.6.4; SD Y.P.3.6.4; DB Y.P.4.1.2; SD Y.P.4.1.2; DB Y.P.5.3.3; SD Y.P.5.3.3; DB Y.P.5.4.3; SD Y.P.5.4.3; DB HAMB1; SD HAMB1

Όπου SD ή DB ο εκάστοτε οικότυπος και Y.P.X.X.X το στέλεχος εμβολιασμού

Για τον υπολογισμό των σφαλμάτων και την στατιστική σημαντικότητα των μετρήσεων έγινε two way ANOVA

Παρατηρείται πως κατά πλειοψηφία τα φυτάρια οικοτύπου SD έχουν υψηλότερες τιμές δραστικότητας της νιτρογενάσης με εξαίρεση βέβαια το φυτάριο που εμβολιάστηκε με το στέλεχος Y.P.2.2.2. Ο εμβολιασμός με το στέλεχος Y.P.4.1.2 φαίνεται να είχε το καλύτερο αποτέλεσμα για τη δραστικότητα του ενζύμου της

νιτρογενάσης, γεγονός που συνδυαστικά με τις υπόλοιπες μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν σε αυτό το στέλεχος (ανεκτικότητα στην αλατότητα, αζωτοδέσμευση, βιομετρία των φυταρίων μετά από ενέση αυτού στις ρίζες τους) να το καθιστούν εξαιρετικά ενδιαφέρον για δυναμικές εφαρμογές σαν μέρος προβιοτικού βιοσκευάσματος. Εκτός του Y.P.4.1.2 ενδιαφέρον παρουσιάζει και το Y.P.2.2.2 το οποίο φαίνεται και αυτό να ενισχύει με την σειρά του την ανάπτυξη των φυταρίων ενώ παράλληλα αζωτοδεσμεύει και παρουσιάζει ανεκτικότητα σε στρες αλατότητας.

Για όλους αυτούς τους λόγους επιλέχθηκαν τα στελέχη Y.P.2.2.2 & Y.P.4.1.2 για περαιτέρω γονιδιωματική ανάλυση ούτως ώστε να αλληλουχηθούν πλήρως και να αναλυθεί το γονιδιωματικό τους. Με σκοπό να εξαχθούν πληροφορίες για το τί είναι αυτό που τους προσδίδει όλα αυτά τα επιθυμητά χαρακτηριστικά. Για να μελετηθούν επαρκώς τα γονιδιώματα αυτών των ανεκτικών στην αλατότητα, προβιοτικών για τη ροβίνια στελεχών, επιλέχθηκε και το στέλεχος Y.P.3.6.4 για σύγκριση. Το στέλεχος Y.P.3.6.4 παρότι αζωτοδεσμεύει επαρκώς και είναι συγγενικό αυτών (*Mesorhizobium sp.*) παρουσιάζει ευαισθησία στην αλατότητα και η νιτρογενάση του δεν είναι ιδιαίτερα δραστική. Ως αποτέλεσμα κρίνεται πώς είναι σημαντική η σύγκριση αυτών των τριών για να προκύψουν συμπεράσματα σε γονιδιακό επίπεδο. Να βρεθούν γονίδια που δυναμικά προσδίδουν ανεκτικότητα στο στρες αλατότητας και να προσδιορισθούν οι αξιοσημείωτες διαφορές που κάνουν αυτά τα στελέχη να διαφέρουν φαινοτυπικά, παρότι κοντινά εξελικτικά.

3.7 Συγκριτική Γονιδιωματική/Γονιδιωματική Ανάλυση

3.7.1 Ανασύσταση Γονιδιώματος

Στο διαδικτυακό εργαλείο PATRIC της BV-BRC δοκιμάστηκαν ποικιλία εργαλείων ανασύστασης γονιδιώματος και επιλέχθηκε το Unicycler σαν το πλέον κατάλληλο για τα στελέχη που αλληλουχίσαμε.

Πίνακας 3.7.1

Assembly Evaluation

Platform	Strategy	Name	Time to assemble	Short read coverage	Total contigs	Largest contig	Total length	#Ns per 100 kbp	Notes
Illumina	Unicycler	Mesorhizobium YP 222	0.22 hours	69.001	89	1152649	7667130	0	
Illumina	SPAdes	Mesorhizobium YP 222	0.17 hours	68.44	80	1152775	7776250	0	
Illumina	Unicycler	Mesorhizobium YP 364	0.31 hours	102.034	75	1155044	7975843	0	
Illumina	SPAdes	Mesorhizobium YP 364	0.23 hours	100.375	69	888466	7995319	0	
Illumina	Unicycler	Mesorhizobium YP 412	0.13 hours	41.868	127	724069	8029457	0	
Illumina	SPAdes	Mesorhizobium YP 412	0.09 hours	41.863	112	532435	8048730	0	
Illumina	Unicycler	Mesorhizobium YP 412	0.12 hours	41.673	126	724069	8028472	0	

Σύγκριση και χαρακτηρισμός καταλληλότερου εργαλείου ανασύστασης γονιδιώματος.

Από αριστερά προς τα δεξιά: Πλατφόρμα Αλληλούχισης; Στρατηγική/Εργαλείο Ανασύστασης Γονιδιώματος; Χρονική Διάρκεια Ανασύστασης; Κάλυψη μικρών διαβασμάτων; Συνολικά διαβάσματα; Μεγαλύτερο αλληλουχημένο τμήμα; Συνολικό τμήμα ανασυστημένου γονιδιώματος; Πλήθος N ανά 100 kbp.

Βάσει του πίνακα προκύπτει πως το καταλληλότερο εργαλείο ανασύστασης του γονιδιώματος για τις συγκεκριμένες αλληλουχίες των τριών αυτών στελεχών είναι το Unicycler. Επομένως ακολούθησε in silico πρόβλεψη του γονιδιώματος που προέκυψε από την ανασύσταση με χρήση του Unicycler.

3.7.2 Στέλεχος YP 222

Ένα ανασυστημένο γονιδίωμα για το *Mesorhizobium* Y.P.2.2.2 υποβλήθηκε στην υπηρεσία ολοκληρωμένης ανάλυσης γονιδιώματος στο PATRIC[1]. Με βάση τα στατιστικά στοιχεία σχολιασμού και τη σύγκριση με άλλα γονιδιώματα στο PATRIC του ίδιου είδους, το γονιδίωμα αυτό φαίνεται να είναι καλής ποιότητας. Λεπτομέρειες της ανάλυσης, συμπεριλαμβανομένων των γονιδίων ενδιαφέροντος (Specialty Genes), μιας λειτουργικής κατηγοριοποίησης (Subsystems) και ενός φυλογενετικού δέντρου (Phylogenetic Analysis) παρέχονται παρακάτω.

Ανασύσταση γονιδιώματος:

Το ανασυστημένο γονιδίωμα υποβλήθηκε στην υπηρεσία Comprehensive Genome Analysis. Αυτό το γονιδίωμα είχε 89 αλληλουχίες (contigs), με συνολικό μήκος 7.667.130 bp και μέση περιεκτικότητα σε G+C 63,11%

Πίνακας 3.7.2.1.

Table 1. Assembly Details

Contigs	89
GC Content	63.11
Plasmids	0
Contig L50	8
Genome Length	7,667,130 bp
Contig N50	302,214
Chromosomes	0

Φαίνονται τα αποτελέσματα της ανασύστασης του γονιδιώματος. Από πάνω προς τα κάτω το πλήθος των αλληλουχιών (contigs); η περιεκτικότητα σε GC; τα πλασμίδια; το L50 των αλληλουχιών; το μήκος του γονιδιώματος; το N50 των αλληλουχιών; το πλήθος των χρωμοσωμάτων.

Ανοικτού πλαισίου in silico πρόβλεψη γονιδιώματος:

Το γονιδίωμα του *Mesorhizobium* YP 222 προβλέθηκε χρησιμοποιώντας το RAST tool kit (RASTtk)[2] και του αποδόθηκε ένα μοναδικό αναγνωριστικό γονιδιώματος 68287.395. Αυτό το γονιδίωμα ανήκει στο υπερβασίλειο Βακτήρια και σχολιάστηκε με τη χρήση του γενετικού κώδικα 11. Η ταξινόμια αυτού του γονιδιώματος είναι:

Bacteria > Proteobacteria > Alphaproteobacteria > Hyphomicrobiales > Phyllobacteriaceae > *Mesorhizobium*

Αυτό το γονιδίωμα έχει 7.582 αλληλουχίες κωδικοποίησης πρωτεϊνών (CDS), 56 γονίδια transfer RNA (tRNA) και 9 γονίδια ριβοσωμικού RNA (rRNA). Τα σχολιασμένα χαρακτηριστικά συνοφίζονται στον πίνακα 3.7.1.2.

Πίνακας 3.7.1.2

CDS	7,582
tRNA	56
rRNA	9
Partial CDS	0
Miscellaneous RNA	0
Repeat Regions	0

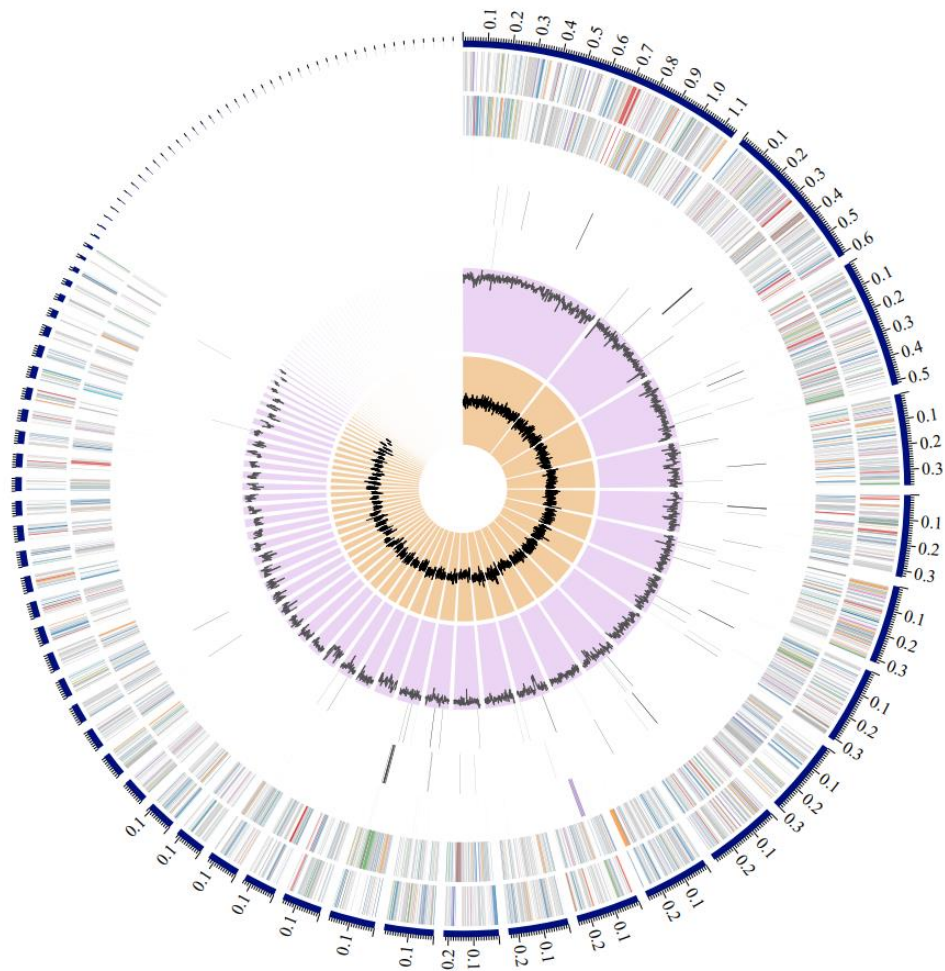
Φαίνονται οι λεπτομέρειες της in-silico πρόβλεψης ανοικτού πλαισίου. Από πάνω προς τα κάτω: Πλήθος CDS; tRNA; rRNA; μερικά CDS; Άγνωστα RNA; Επαναλαμβανόμενες περιοχές;

Η in-silico πρόβλεψη ανοικτού αναγνωστικού πλαισίου (genome assembly) περιλάμβανε 2.206 υποθετικές πρωτεΐνες και 5.376 πρωτεΐνες με λειτουργικές αναθέσεις (Πίνακας 3). Οι πρωτεΐνες με λειτουργικές αναθέσεις περιλάμβαναν 1.445 πρωτεΐνες με αριθμούς Enzyme Commission (EC)[3], 1.260 με αναθέσεις Gene Ontology (GO)[4] και 1.135 πρωτεΐνες που αντιστοιχίστηκαν σε μονοπάτια KEGG[5]. Ο σχολιασμός PATRIC περιλαμβάνει δύο τύπους πρωτεϊνικών οικογενειών[6], και αυτό το γονιδίωμα έχει 6.828 πρωτεΐνες που ανήκουν στις ειδικές για το γένος πρωτεϊνικές οικογένειες (PLFams) για , και 6.963 πρωτεΐνες που ανήκουν στις διαγενεακές πρωτεϊνικές οικογένειες (PGFams).

Πίνακας 3.7.2.3: Πρωτεΐνες που προβλέφθηκαν με χρήση των αλγορίθμων του PATRIC

Hypothetical proteins	2,206
Proteins with functional assignments	5,376
Proteins with EC number assignments	1,445
Proteins with GO assignments	1,260
Proteins with Pathway assignments	1,135
Proteins with PATRIC genus-specific family (PLfam) assignments	6,828
Proteins with PATRIC cross-genus family (PGfam) assignments	6,963

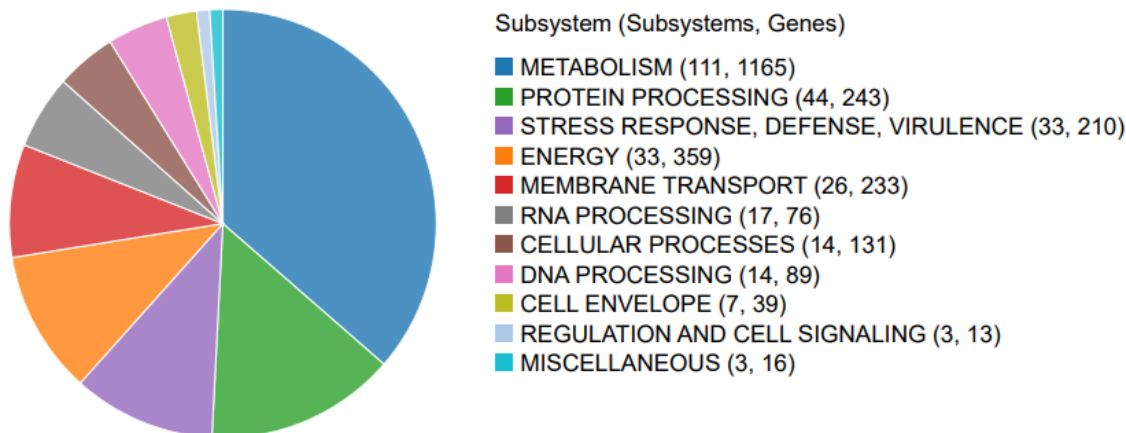
Παρέχεται μια κυκλική γραφική απεικόνιση της κατανομής των σχολιασμών του γονιδιώματος (Εικόνα 3.7.2.4). Αυτή περιλαμβάνει, από τους εξωτερικούς προς τους εσωτερικούς δακτυλίους, τα contigs, τα CDS στην εμπρόσθια αλυσίδα, τα CDS στην οπίσθια αλυσίδα, τα γονίδια RNA, τα CDS με ομολογία σε γνωστά γονίδια αντιμικροβιακής αντοχής, τα CDS με ομολογία σε γνωστούς παράγοντες ιογένεσης, την περιεκτικότητα σε GC και την κλίση GC. Τα χρώματα των CDS στην εμπρόσθια και την οπίσθια αλυσίδα υποδεικνύουν το υποσύστημα στο οποίο ανήκουν τα γονίδια αυτά (βλ. υποσυστήματα παρακάτω).



Εικόνα 3.7.2.4: Κυκλική γραφική απεικόνιση της κατανομής των *in silico* προβλέψεων του γονιδιώματος του στελέχους Y.P 2.2.2

Ανάλυση υποσυστημάτων:

Σαν υποσύστημα νοείτε μια ομάδα πρωτεϊνων που μαζί συντελεί μια βιολογική διεργασία ή αποτελεί ένα δομικό σύμπλοκο. Το εργαλείο πρόβλεψης του PATRIC, παρέχει ανάλυση των υποσυστημάτων του εκάστοτε γονιδιώματος. Παρακάτω φαίνεται η ανάλυση υποσυστημάτων για το συγκεκριμένο στέλεχος



Εικόνα 3.7.2.3: Γράφημα πίτας για τα υποσυστήματα που βρέθηκαν μέσω του εργαλείου PATRIC, και οι αντίστοιχοι εκπρόσωποί τους ποσοτικοποιημένοι στην μορφή (υποσύστημα, γονίδια). Φαίνεται κατά σειρά πλήθους υποσυστήματα και τα αντίστοιχα γονιδιά τους που σχετίζονται με: Το μεταβολισμό; Την επεξεργασία πρωτεϊνών; Την άμυνα έναντι σε καταπόνηση και ιούς; Την ενέργεια του μικροβίου; Την διαμεμβρανική μετακίνηση; Την επεξεργασία RNA; Τις κυτταρικές διεργασίες; Την επεξεργασία DNA; Τον κυτταρικό φάκελο; Την κυτταρική σηματοδότηση; Άγνωστα- διαφορά

Γονίδια ειδικότητας:

Πολλά από τα γονίδια υποθετικά γονίδια έχουν ομολογία με γνωστούς μεταφορείς[8], παράγοντες μολυσματικότητας[9][10], στόχους φαρμάκων[11][12] και γονίδια ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά[13]. Παρέχεται ο αριθμός των γονιδίων και η συγκεκριμένη βάση δεδομένων προέλευσης στην οποία βρέθηκε ομολογία (Πίνακας 3.7.2.4).

Πίνακας 3.7.2.4 Γονίδια ειδικότητας	
Γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά	42
Γονίδια στόχοι φαρμάκων	3
Τρανσπόρτερς	26
Μολυσματικοί παράγοντες	>32

Φαίνεται από πάνω προς τα κάτω: Γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά (πλήθος); Γονίδια στόχοι φαρμάκων (πλήθος); Τρανσπόρτερς (πλήθος); Μολυσματικοί παράγοντες (πλήθος)

Γονίδια αντιμικροβιακής δράσης (AMR):

Η Υπηρεσία Προσδιορισμού Γονιδιώματος στο PATRIC χρησιμοποιεί τη μέθοδο ανίχνευσης γονιδίων AMR με βάση το k-mer, η οποία χρησιμοποιεί την επιμελημένη συλλογή του PATRIC με αντιπροσωπευτικές παραλλαγές αλληλουχιών γονιδίων AMR[1] και αποδίδει σε κάθε γονίδιο AMR λειτουργικό σχολιασμό, ευρύ μηχανισμό ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά, κατηγορία φαρμάκων και, σε ορισμένες περιπτώσεις, συγκεκριμένο αντιβιοτικό στο οποίο προσδίδει ανθεκτικότητα. Επισημαίνεται ότι η παρουσία γονιδίων που σχετίζονται με AMR (ακόμη και πλήρους μήκους) σε ένα δεδομένο γονιδίωμα δεν συνεπάγεται άμεσα φαινότυπο ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά. Είναι σημαντικό να λαμβάνονται υπόψη οι συγκεκριμένοι μηχανισμοί AMR και ιδίως η απουσία/παρουσία μεταλλάξεων SNP που μεταδίδουν ανθεκτικότητα. Μια περίληψη των γονιδίων AMR που έχουν σχολιαστεί σε αυτό το γονιδίωμα και του αντίστοιχου μηχανισμού AMR παρέχεται στον πίνακα 3.7.2.5.

Πίνακας 3.7.2.5 Γονίδια αντιμικροβιακής ανθεκτικότητας.

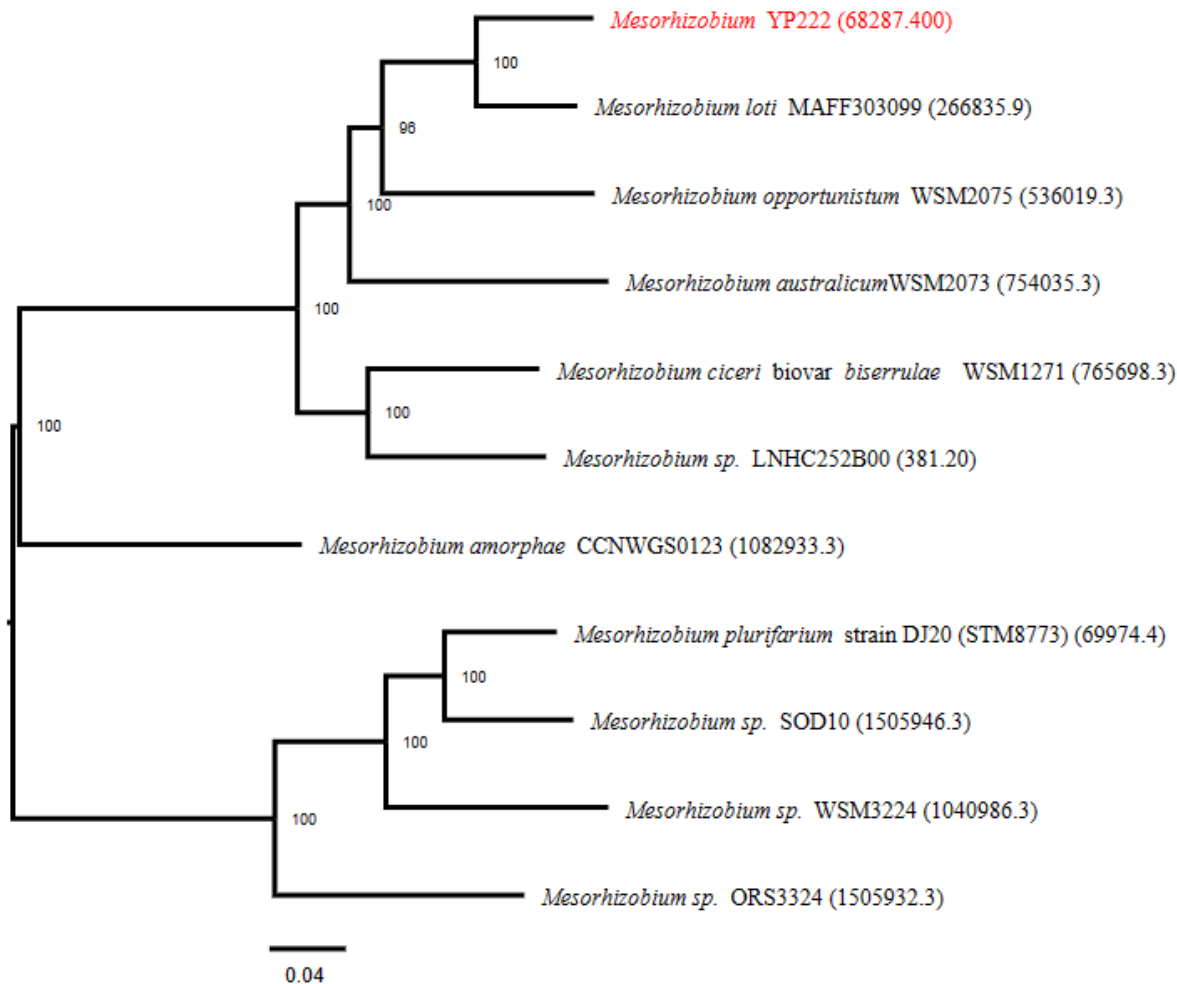
AMR Mechanism	Genes
Antibiotic activation enzyme	KatG
Antibiotic inactivation enzyme	APH(3')-I, FosX
Antibiotic target in susceptible species	Alr, Ddl, EF-G, EF-Tu, folA, Dfr, folP, gyrA, gyrB, inhA, fabI, Iso-tRNA, kasA, MurA, rho, rpoB, rpoC, S10p, S12p
Efflux pump conferring antibiotic resistance	MdtABC-TolC, TriABC-OpmH
Gene conferring resistance via absence	gidB
Protein altering cell wall charge conferring antibiotic resistance	GdpD, PgsA
Regulator modulating expression of antibiotic resistance genes	OxyR

Φαίνονται από πάνω προς τα κάτω: Αντιμικροβιακοί μηχανισμοί και τα αντίστοιχα γονίδια που εντοπίστηκαν στην in silico πρόβλεψη του γονιδιώματος

Φυλογενετική Ανάλυση:

Το προσωπικό του Εθνικού Κέντρου Βιοτεχνολογικών Πληροφοριών (NCBI) επιλέγει και κατηγοριοποιεί χειροκίνητα τα γονιδιώματα αναφοράς και τα αντιπροσωπευτικά γονιδιώματα, τα οποία θεωρεί ότι είναι υψηλής ποιότητας και σημασίας για την ερευνητική κοινότητα. Το PATRIC παρέχει τα γονιδιώματα αναφοράς και τα αντιπροσωπευτικά γονιδιώματα και τα περιλαμβάνει στη φυλογενετική ανάλυση που αποτελεί μέρος της έκθεσης Comprehensive Genome Analysis. Τα πλησιέστερα γονιδιώματα αναφοράς και αντιπροσωπευτικά γονιδιώματα σε εντοπίστηκαν από το Mash/MinHash[15]. Από αυτά τα γονιδιώματα επιλέχθηκαν οι παγκόσμιες πρωτεϊνικές οικογένειες PATRIC (PGFams)[6] για τον προσδιορισμό της φυλογενετικής τοποθέτησης αυτού του γονιδιώματος. Οι πρωτεϊνικές αλληλουχίες από αυτές τις οικογένειες στοιχίστηκαν με το MUSCLE[17] και τα νουκλεοτίδια για κάθε μία από αυτές τις αλληλουχίες αντιστοιχίστηκαν στην πρωτεϊνική στοιχίση. Το κοινό σύνολο των ευθυγραμμίσεων αμινοξέων και νουκλεοτιδίων συνενώθηκε σε έναν πίνακα δεδομένων και χρησιμοποιήθηκε το RaxML[18] για την

ανάλυση αυτού του πίνακα, ενώ χρησιμοποιήθηκε γρήγορο bootstrapping[19] για τη δημιουργία των τιμών υποστήριξης στο δέντρο (Εικόνα 3).



Εικόνα 3.7.2.5 Φυλλογενετικό δένδρο για το στέλεχος Y.P. 2.2.2

3.7.3 Στέλεχος YP 364

Ένα συναρμολογημένο γονιδίωμα για το *Mesorhizobium* YP 364 υποβλήθηκε στην υπηρεσία ολοκληρωμένης ανάλυσης γονιδιώματος στο PATRIC[1]. Με βάση τα στατιστικά στοιχεία σχολιασμού και τη σύγκριση με άλλα γονιδιώματα στο PATRIC του ίδιου είδους, το γονιδίωμα αυτό φαίνεται να είναι καλής ποιότητας. Λεπτομέρειες της ανάλυσης, συμπεριλαμβανομένων των γονιδίων ενδιαφέροντος (Specialty Genes), μιας λειτουργικής κατηγοριοποίησης (Subsystems) και ενός φυλογενετικού δέντρου (Phylogenetic Analysis) παρέχονται παρακάτω.

Ανασύσταση γονιδιώματος:

Το ανααστημένο γονιδίωμα υποβλήθηκε στην υπηρεσία Comprehensive Genome Analysis. Αυτό το ανααστημένο γονιδίωμα είχε 75 contigs, με συνολικό μήκος 7.975.843 ζ.β. και μέση περιεκτικότητα σε G+C 62,29% (Πίνακας 3.7.3.1).

Πίνακας 3.7.3.1:

Contigs	75
GC Content	62.29
Plasmids	0
Contig L50	6
Genome Length	7,975,843 bp
Contig N50	506,715
Chromosomes	0

Φαίνονται τα αποτελέσματα της ανασύστασης του γονιδιώματος. Από πάνω προς τα κάτω το πλήθος των contigs; η περιεκτικότητα σε GC; τα πλασμίδια; το L50 των contigs; το μήκος του γονιδιώματος; το N50 των contigs; το πλήθος των χρωμοσωμάτων.

Το ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο του γονιδιώματος του *Mesorhizobium* YP 364 προβλέφθηκε *in silico* χρησιμοποιώντας το RAST tool kit (RASTtk)[2] και του αποδόθηκε ένα μοναδικό αναγνωριστικό γονιδιώματος 68287.396. Αυτό το γονιδίωμα ανήκει στο υπερβασίλειο Βακτήρια και σχολιάστηκε με τη χρήση του γενετικού κώδικα 11. Η ταξινόμιά αυτού του γονιδιώματος είναι:

Bacteria > Proteobacteria > Alphaproteobacteria > Hyphomicrobiales > Phyllobacteriaceae > *Mesorhizobium*

Αυτό το γονιδίωμα έχει 8.092 αλληλουχίες κωδικοποίησης πρωτεϊνών (CDS), 53 γονίδια transfer RNA (tRNA) και 6 γονίδια ριβοσωμικού RNA (rRNA). Τα χαρακτηριστικά που προβλέφθηκαν συνοψίζονται στον πίνακα 3.7.3.2.

Πίνακας 3.7.3.2 Λεπτομέρειες πρόβλεψης γονιδιώματος :

CDS	8,092
tRNA	53
rRNA	6
Partial CDS	0
Miscellaneous RNA	0
Repeat Regions	0

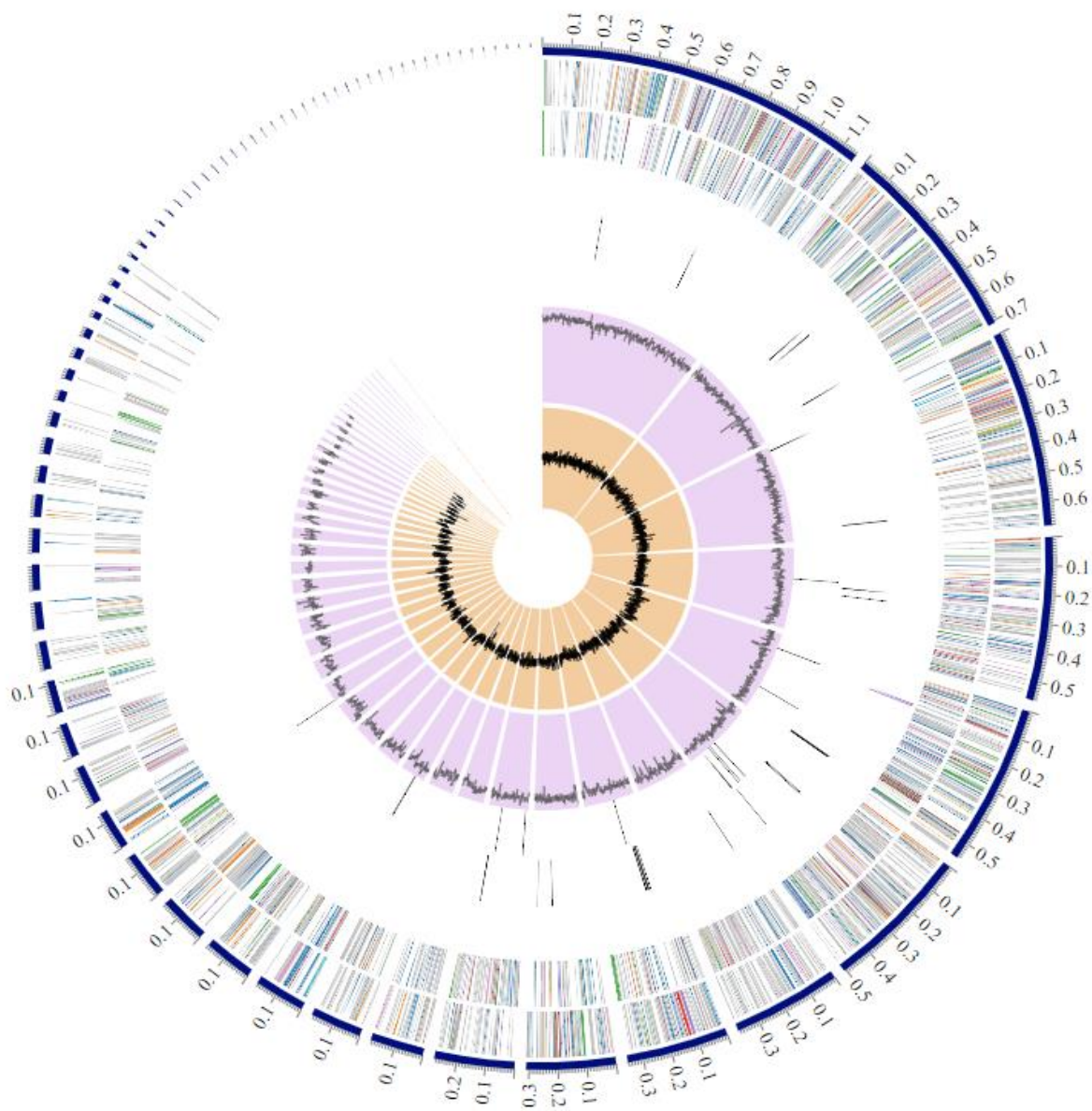
Φαίνονται οι λεπτομέρειες της *in-silico* πρόβλεψης ανοικτού πλαισίου. Από πάνω προς τα κάτω: Πλήθος CDS; tRNA; rRNA; μερικά CDS; Άγνωστα RNA; Επαναλαμβανόμενες περιοχές;

Η πρόβλεψη περιελάμβανε 2.632 υποθετικές πρωτεΐνες και 5.460 πρωτεΐνες με λειτουργικές αναθέσεις (Πίνακας 3.7.2.3). Οι πρωτεΐνες με λειτουργικές αναθέσεις περιλάμβαναν 1.478 πρωτεΐνες με αριθμούς Enzyme Commission (EC)[3], 1.299 με αναθέσεις Gene Ontology (GO)[4] και 1.159 πρωτεΐνες που αντιστοιχίστηκαν σε μονοπάτια KEGG[5]. Η in silico πρόβλεψη που προκύπτει PATRIC περιλαμβάνει δύο τύπους πρωτεϊνικών οικογενειών[6], και αυτό το γονιδίωμα έχει 7.117 πρωτεΐνες που ανήκουν στις ειδικές για το γένος πρωτεϊνικές οικογένειες (PLFams) για , και 7.249 πρωτεΐνες που ανήκουν στις διαγενεακές πρωτεϊνικές οικογένειες (PGFams).

Πίνακας 3.7.3.3: Πρωτεΐνες που προβλέφθηκαν με χρήση των αλγορίθμων του PATRIC.

Hypothetical proteins	2,632
Proteins with functional assignments	5,460
Proteins with EC number assignments	1,478
Proteins with GO assignments	1,299
Proteins with Pathway assignments	1,159
Proteins with PATRIC genus-specific family (PLfam) assignments	7,117
Proteins with PATRIC cross-genus family (PGfam) assignments	7,249

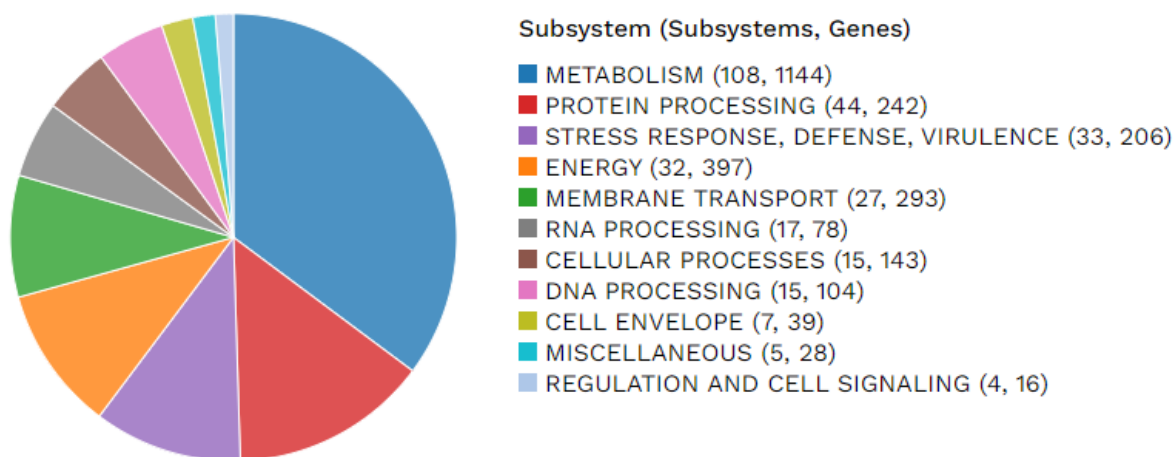
Παρέχεται μια κυκλική γραφική απεικόνιση της κατανομής των σχολιασμών του γονιδιώματος (Εικόνα 1). Αυτή περιλαμβάνει, από τους εξωτερικούς προς τους εσωτερικούς δακτυλίους, τα contigs, τα CDS στην εμπρόσθια αλυσίδα, τα CDS στην οπίσθια αλυσίδα, τα γονίδια RNA, τα CDS με ομολογία σε γνωστά γονίδια αντιμικροβιακής αντοχής, τα CDS με ομολογία σε γνωστούς παράγοντες ιογένεσης, την περιεκτικότητα σε GC και την κλίση GC. Τα χρώματα των CDS στην εμπρόσθια και την οπίσθια αλυσίδα υποδεικνύουν το υποσύστημα στο οποίο ανήκουν τα γονίδια αυτά (βλ. υποσυστήματα παρακάτω).



Εικόνα 3.7.3.4: Κυκλική γραφική απεικόνιση της κατανομής των σχολιασμών του γονιδιώματος του στελέχους Υ.Ρ 3.6.4

Ανάλυση υποσυστήματος:

Ένα υποσύστημα είναι ένα σύνολο πρωτεϊνών που από κοινού υλοποιούν μια συγκεκριμένη βιολογική διαδικασία ή ένα δομικό σύμπλεγμα[7] και η πρόβλεψη του PATRIC περιλαμβάνει μια ανάλυση των υποσυστημάτων που είναι μοναδικά σε κάθε γονιδίωμα. Μια επισκόπηση των υποσυστημάτων για αυτό το γονιδίωμα παρέχεται στην Εικόνα 3.7.3.5



Εικόνα 3.7.3.5

Γράφημα πίτας για τα υποσυστήματα που βρέθηκαν μέσω του εργαλείου PATRIC, και οι αντίστοιχοι εκπρόσωποί τους ποσοτικοποιημένοι στην μορφή (υποσύστημα, γονίδια). Φαίνεται κατά σειρά πλήθους υποσυστήματα και τα αντίστοιχα γονιδιά τους που σχετίζονται με: Το μεταβολισμό; Την επεξεργασία πρωτεϊνών; Την άμυνα έναντι σε καταπόνηση και ιούς; Την ενέργεια του μικροβίου; Την διαμεμβρανική μετακίνηση; Την επεξεργασία RNA; Τις κυτταρικές διεργασίες; Την επεξεργασία DNA; Τον κυτταρικό φάκελο; Άγνωστα- διαφορά; Την κυτταρική σηματοδότηση;

Γονίδια ειδικότητας:

Πολλά από τα γονίδια που έχουν σχολιαστεί σε έχουν ομολογία με γνωστούς μεταφορείς[8], παράγοντες μολυσματικότητας[9][10], στόχους φαρμάκων[11][12] και γονίδια ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά[13]. Παρέχεται ο αριθμός των γονιδίων και η συγκεκριμένη βάση δεδομένων προέλευσης στην οποία βρέθηκε ομολογία (Πίνακας 3.7.3.4).

Πίνακας 3.7.3.4 Γονίδια ειδικότητας	
Γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά	42
Γονίδια στόχοι φαρμάκων	4
Τρανσπόρτες	25
Μολυσματικοί παράγοντες	>32

Όπου φαίνεται από πάνω προς τα κάτω: Γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά (πλήθος); Γονίδια στόχοι φαρμάκων (πλήθος); Τρανσπόρτες (πλήθος); Μολυσματικοί παράγοντες (πλήθος)

Γονίδια αντιμικροβιακής ανθεκτικότητας (AMR):

Η Υπηρεσία Προσδιορισμού Γονιδιώματος στο PATRIC χρησιμοποιεί τη μέθοδο ανίχνευσης γονιδίων AMR με βάση το k-mer, η οποία χρησιμοποιεί την επιμελημένη συλλογή του PATRIC με αντιπροσωπευτικές παραλλαγές αλληλουχιών γονιδίων AMR[1] και αποδίδει σε κάθε γονίδιο AMR λειτουργικό σχολιασμό, ευρύ μηχανισμό ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά, κατηγορία φαρμάκων και, σε ορισμένες περιπτώσεις, συγκεκριμένο αντιβιοτικό στο οποίο προσδίδει ανθεκτικότητα. Επισημαίνεται ότι η παρουσία γονιδίων που σχετίζονται με AMR (ακόμη και πλήρους μήκους) σε ένα δεδομένο γονιδίωμα δεν συνεπάγεται άμεσα φαινότυπο ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά. Είναι σημαντικό να λαμβάνονται υπόψη οι συγκεκριμένοι μηχανισμοί AMR και ιδίως η απουσία/παρουσία μεταλλάξεων SNP που μεταδίδουν ανθεκτικότητα. Μια περίληψη των γονιδίων AMR που έχουν σχολιαστεί σε αυτό το γονιδίωμα και του αντίστοιχου μηχανισμού AMR παρέχεται στον πίνακα 3.7.3.5.

Πίνακας 3.7.3.5 Γονίδια αντιμικροβιακής ανθεκτικότητας.

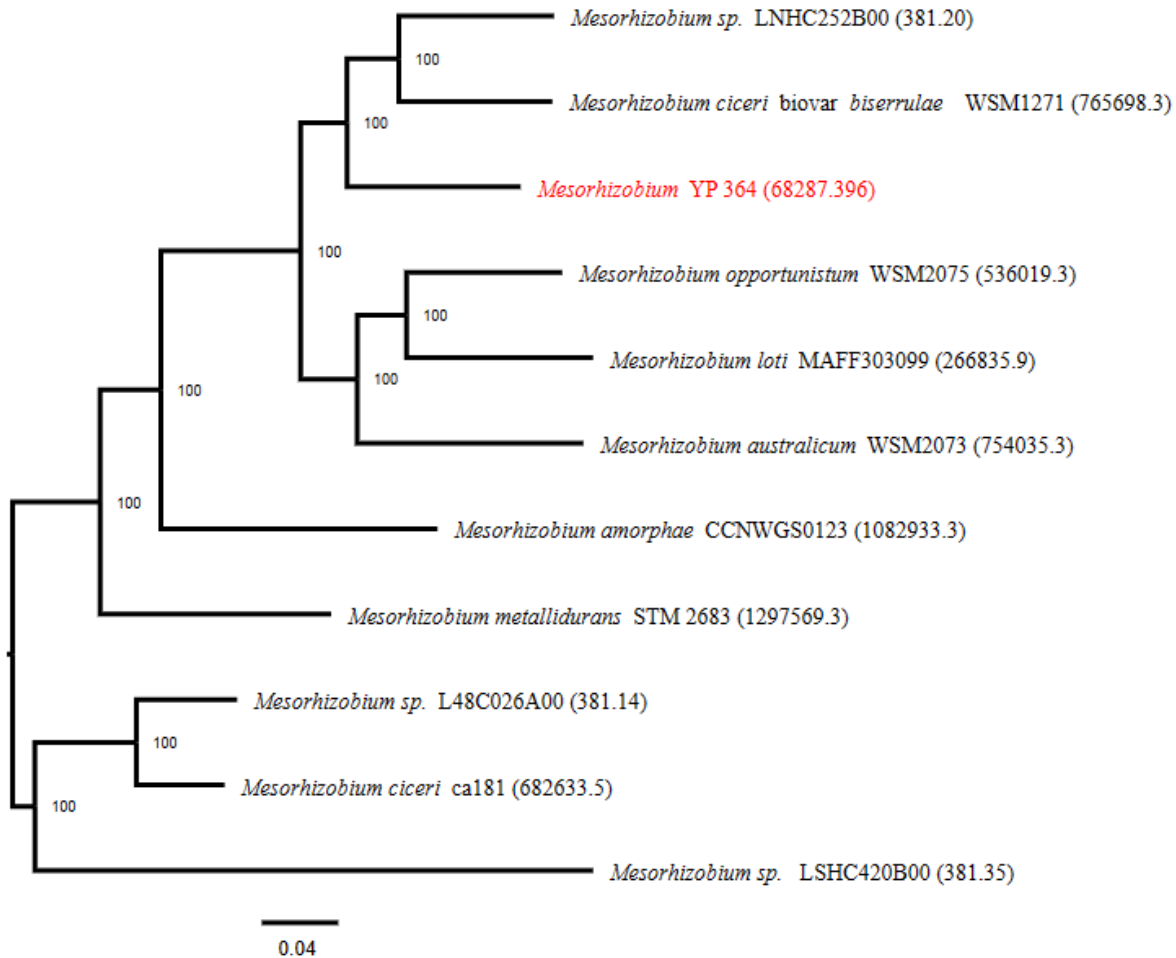
AMR Mechanism	Genes
Antibiotic activation enzyme	KatG
Antibiotic inactivation enzyme	
Antibiotic target in susceptible species	Alr, Ddl, EF-G, EF-Tu, folA, Dfr, folP, gyrA, gyrB, inhA, fabI, Iso-tRNA, kasA, MurA, rho, rpoB, rpoC, S10p, S12p
Efflux pump conferring antibiotic resistance	MdtABC-TolC, TriABC-OpmH
Gene conferring resistance via absence	gidB
Protein altering cell wall charge conferring antibiotic resistance	GdpD, PgsA
Regulator modulating expression of antibiotic resistance genes	OxyR

Φαίνονται από πάνω προς τα κάτω: Αντιμικροβιακοί μηχανισμοί και τα αντίστοιχα γονίδια που εντοπίστηκαν στην in silico πρόβλεψη του γονιδιώματος

Φυλογενετική ανάλυση:

Το προσωπικό του Εθνικού Κέντρου Βιοτεχνολογικών Πληροφοριών (NCBI) επιλέγει και κατηγοριοποιεί χειροκίνητα τα γονιδιώματα αναφοράς και τα αντιπροσωπευτικά γονιδιώματα, τα οποία θεωρεί ότι είναι υψηλής ποιότητας και σημασίας για την ερευνητική κοινότητα. Το PATRIC παρέχει τα γονιδιώματα αναφοράς και τα αντιπροσωπευτικά γονιδιώματα και τα περιλαμβάνει στη φυλογενετική ανάλυση που αποτελεί μέρος της έκθεσης Comprehensive Genome Analysis. Τα πλησιέστερα γονιδιώματα αναφοράς και αντιπροσωπευτικά γονιδιώματα σε εντοπίστηκαν από το Mash/MinHash[15]. Από αυτά τα γονιδιώματα επιλέχθηκαν οι παγκόσμιες πρωτεϊνικές οικογένειες PATRIC (PGFams)[6] για τον προσδιορισμό της φυλογενετικής τοποθέτησης αυτού του γονιδιώματος. Οι πρωτεϊνικές αλληλουχίες από αυτές τις οικογένειες στοιχίστηκαν με το MUSCLE[17] και τα νουκλεοτίδια για κάθε μία από αυτές τις αλληλουχίες αντιστοιχίστηκαν στην πρωτεϊνική στοιχίση. Το κοινό σύνολο των ευθυγραμμίσεων αμινοξέων και

νοκλεοτιδίων συνενώθηκε σε έναν πίνακα δεδομένων και χρησιμοποιήθηκε το RaxML[18] για την ανάλυση αυτού του πίνακα, ενώ χρησιμοποιήθηκε γρήγορο bootstrapping[19] για τη δημιουργία των τιμών υποστήριξης στο δέντρο.



Εικόνα 3.7.3.1 Φυλογενετικό δένδρο για το στέλεχος Y.P. 3.6.4

3.7.4 Στέλεχος YP 412

Οι αναγνώσεις για το *Mesorhizobium* YP 412 υποβλήθηκαν στην υπηρεσία ολοκληρωμένης ανάλυσης γονιδιώματος PATRIC[1]. Με βάση τα στατιστικά στοιχεία σχολιασμού και τη σύγκριση με άλλα γονιδιώματα στο PATRIC του ίδιου είδους, το γονιδίωμα αυτό φαίνεται να είναι καλής ποιότητας. Λεπτομέρειες της ανάλυσης, συμπεριλαμβανομένων των γονιδίων ενδιαφέροντος (Specialty Genes), μιας λειτουργικής κατηγοριοποίησης (Subsystems) και ενός φυλογενετικού δέντρου (Phylogenetic Analysis) παρέχονται παρακάτω.

Ανασύσταση γονιδιώματος:

Το *Mesorhizobium* YP 412 ανασυστάθηκε με τη χρήση του auto[2]. Υπήρχαν 127 contigs, εκτιμώμενο μήκος γονιδιώματος 8.029.457 bp και μέσο περιεχόμενο G+C 62,22%. Το μήκος N50, το οποίο ορίζεται

ως το μικρότερο μήκος αλληλουχίας στο 50% του γονιδιώματος, είναι 185.910 bp. Ο αριθμός L50, ο οποίος ορίζεται ως ο μικρότερος αριθμός contigs των οποίων το άθροισμα μήκους παράγει το N50, είναι 14 (Πίνακας 3.7.4.1).

Πίνακας 3.7.4.1:

Contigs	127
GC Content	62.22
Plasmids	0
Contig L50	14
Genome Length	8,029,457 bp
Contig N50	185,910
Chromosomes	0

Φαίνονται τα αποτελέσματα της ανασύστασης του γονιδιώματος. Από πάνω προς τα κάτω το πλήθος των contigs; η περιεκτικότητα σε GC; τα πλασμίδια; το L50 των contigs; το μήκος του γονιδιώματος; το N50 των contigs; το πλήθος των χρωμοσωμάτων.

Ανοικτού πλαισίου in silico πρόβλεψη γονιδιώματος:

Το γονιδίωμα του *Mesorhizobium* YP 412 σχολιάστηκε χρησιμοποιώντας το RAST tool kit (RASTtk)[3] και του αποδόθηκε ένα μοναδικό αναγνωριστικό γονιδιώματος 68287.405. Αυτό το γονιδίωμα ανήκει στο υπερκλάδος Βακτήρια και σχολιάστηκε με τη χρήση του γενετικού κώδικα 11. Η ταξινόμια αυτού του γονιδιώματος είναι:

Bacteria > Proteobacteria > Alphaproteobacteria > Hyphomicrobiales > Phyllobacteriaceae > *Mesorhizobium*

Το γονιδίωμα αυτό έχει 8.209 αλληλουχίες κωδικοποίησης πρωτεϊνών (CDS), 52 γονίδια transfer RNA (tRNA) και 6 γονίδια ριβοσωμικού RNA (rRNA). Τα θεωρητικά χαρακτηριστικά που προβλέφθηκαν in silico συνοψίζονται στον πίνακα 3.7.4.2.

Πίνακας 3.7.4.2 Λεπτομέρειες πρόβλεψης γονιδιώματος

CDS	8,209
tRNA	52
rRNA	6
Partial CDS	0
Miscellaneous RNA	0
Repeat Regions	0

Φαίνονται οι λεπτομέρειες της in-silico πρόβλεψης ανοικτού πλαισίου. Από πάνω προς τα κάτω: Πλήθος CDS; tRNA; rRNA; μερικά CDS; Άγνωστα RNA; Επαναλαμβανόμενες περιοχές; Χαρακτηριστική ταυτότητα διεργασίας του Patric; αρχή της διεργασίας; Περάτωση της διεργασίας; Συνολικός χρόνος.

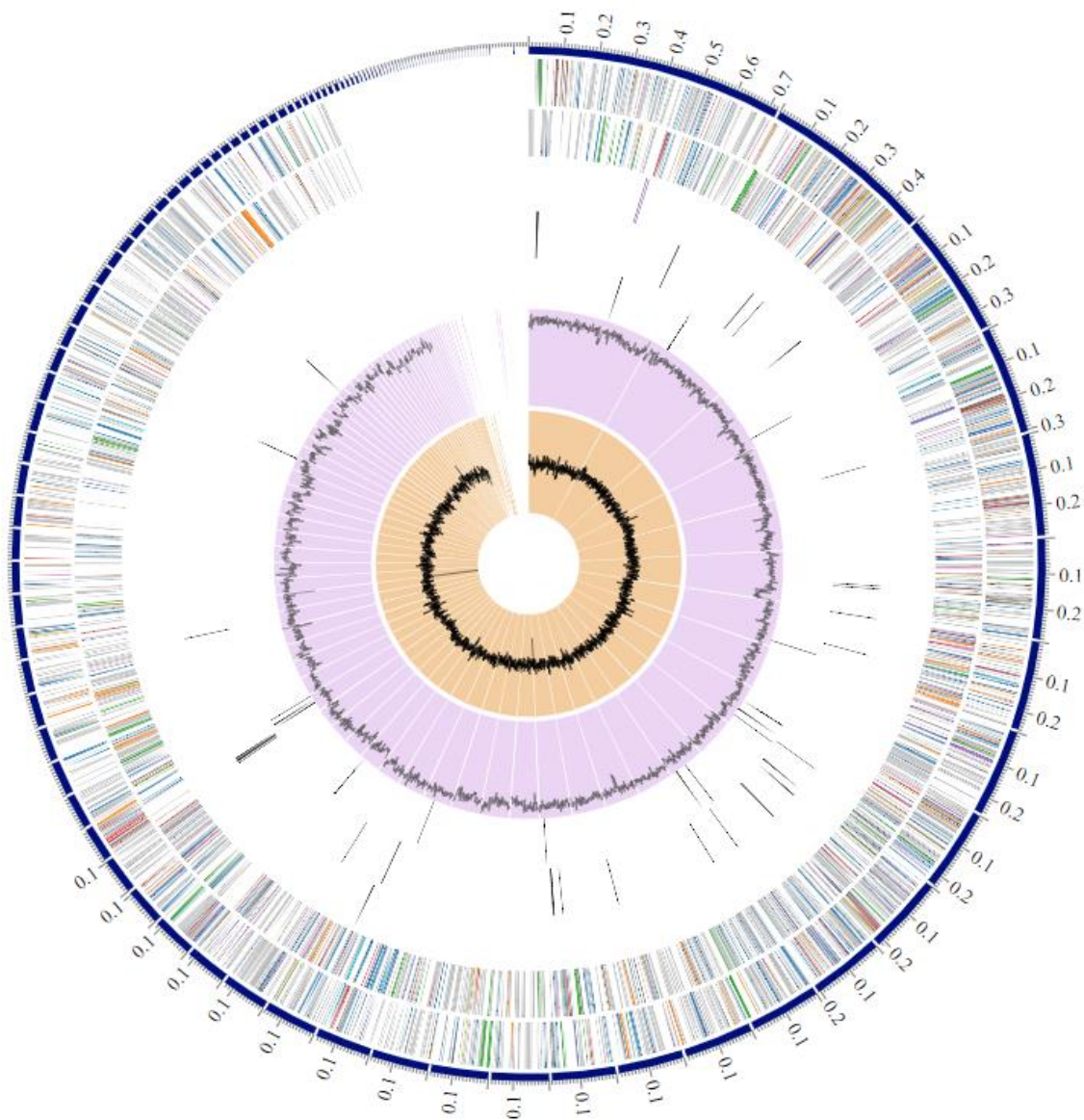
Η πρόβλεψη περιελάμβανε 2.678 υποθετικές πρωτεΐνες και 5.531 πρωτεΐνες με λειτουργικές αναθέσεις (Πίνακας 3.7.4.3). Οι πρωτεΐνες με λειτουργικές αναθέσεις περιλάμβαναν 1.523 πρωτεΐνες με αριθμούς Enzyme Commission (EC)[4], 1.338 με αναθέσεις Gene Ontology (GO)[5] και 1.200 πρωτεΐνες που αντιστοιχίστηκαν σε μονοπάτια KEGG[6]. Ο σχολιασμός PATRIC περιλαμβάνει δύο τύπους πρωτεϊνικών οικογενειών[7], και αυτό το γονιδίωμα έχει 7.241 πρωτεΐνες που ανήκουν στις ειδικές για το γένος πρωτεϊνικές οικογένειες (PLFams) για , και 7.356 πρωτεΐνες που ανήκουν στις διαγενεακές πρωτεϊνικές οικογένειες (PGFams).

Πίνακας 3.7.4.3: Πρωτεΐνες που προβλέφθηκαν με χρήση των αλγορίθμων του PATRIC.

Hypothetical proteins	2,678
Proteins with functional assignments	5,531
Proteins with EC number assignments	1,523
Proteins with GO assignments	1,338
Proteins with Pathway assignments	1,200
Proteins with PATRIC genus-specific family (PLfam) assignments	7,241
Proteins with PATRIC cross-genus family (PGfam) assignments	7,356

Παρέχεται μια κυκλική γραφική απεικόνιση της κατανομής των σχολιασμών του γονιδιώματος (Εικόνα 3.7.4.4). Αυτή περιλαμβάνει, από τους εξωτερικούς προς τους εσωτερικούς δακτυλίους, τα contigs, τα CDS στην εμπρόσθια αλυσίδα, τα CDS στην οπίσθια αλυσίδα, τα γονίδια RNA, τα CDS με ομολογία σε γνωστά

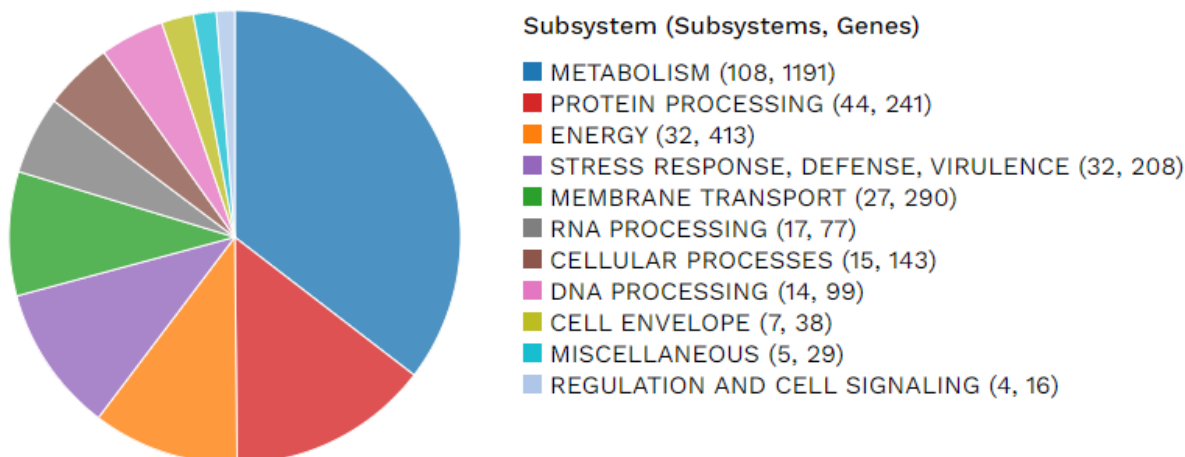
γονίδια αντιμικροβιακής αντοχής, τα CDS με ομολογία σε γνωστούς παράγοντες ιογένεσης, την περιεκτικότητα σε GC και την κλίση GC. Τα χρώματα των CDS στην εμπρόσθια και την οπίσθια αλυσίδα υποδεικνύουν το υποσύστημα στο οποίο ανήκουν τα γονίδια αυτά (βλ. υποσυστήματα παρακάτω).



Εικόνα 3.7.4.4: Κυκλική γραφική απεικόνιση της κατανομής των σχολιασμών του γονιδιώματος του στελέχους Y.P 4.1.2

Ανάλυση υποσυστήματος:

Ένα υποσύστημα είναι ένα σύνολο πρωτεϊνών που από κοινού υλοποιούν μια συγκεκριμένη βιολογική διαδικασία ή ένα δομικό σύμπλεγμα[8] και ο σχολιασμός PATRIC περιλαμβάνει μια ανάλυση των υποσυστημάτων που είναι μοναδικά σε κάθε γονιδίωμα. Μια επισκόπηση των υποσυστημάτων για αυτό το γονιδίωμα παρέχεται στην Εικόνα 3.7.4.5.



Εικόνα 3.7.4.5 :

Γράφημα πίτας για τα υποσυστήματα που βρέθηκαν μέσω του εργαλείου PATRIC, και οι αντίστοιχοι εκπρόσωποί τους ποσοτικοποιημένοι στην μορφή (υποσύστημα, γονίδια). Φαίνεται κατά σειρά πλήθους υποσυστήματα και τα αντίστοιχα γονιδια τους που σχετίζονται με: Το μεταβολισμό; Την επεξεργασία πρωτεϊνών; Την άμυνα έναντι σε καταπόνηση και ιούς; Την ενέργεια του μικροβίου; Την διαμεμβρανική μετακίνηση; Την επεξεργασία RNA; Τις κυτταρικές διεργασίες; Την επεξεργασία DNA; Τον κυτταρικό φάκελο; Άγνωστα- διαφορά; Την κυτταρική σηματοδότηση;

Γονίδια ειδικότητας:

Πολλά από τα γονίδια που έχουν σχολιαστεί σε έχουν ομολογία με γνωστούς μεταφορείς[9], παράγοντες μολυσματικότητας[10][11], στόχους φαρμάκων[12][13] και γονίδια ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά[14]. Παρέχεται ο αριθμός των γονιδίων και η συγκεκριμένη βάση δεδομένων προέλευσης στην οποία βρέθηκε ομολογία (Πίνακας 3.7.4.4).

Πίνακας 3.7.4.4 Γονίδια ειδικότητας	
Γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά	42
Γονίδια στόχοι φαρμάκων	4
Τρανσπόρτερς	24
Μολυσματικοί παράγοντες	>31

Όπου φαίνεται από πάνω προς τα κάτω: Γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά (πλήθος); Γονίδια στόχοι φαρμάκων (πλήθος); Τρανσπόρτερς (πλήθος); Μολυσματικοί παράγοντες (πλήθος)

Γονίδια αντιμικροβιακής ανοχής (AMR):

Η Υπηρεσία Προσδιορισμού Γονιδιώματος στο PATRIC χρησιμοποιεί τη μέθοδο ανίχνευσης γονιδίων AMR με βάση το k-mer, η οποία χρησιμοποιεί την επιμελημένη συλλογή του PATRIC με αντιπροσωπευτικές παραλλαγές αλληλουχιών γονιδίων AMR[1] και αποδίδει σε κάθε γονίδιο AMR λειτουργικό σχολιασμό, ευρύ μηχανισμό ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά, κατηγορία φαρμάκων και, σε ορισμένες περιπτώσεις, συγκεκριμένο αντιβιοτικό στο οποίο προσδίδει ανθεκτικότητα. Επισημαίνεται ότι

η παρουσία γονιδίων που σχετίζονται με AMR (ακόμη και πλήρους μήκους) σε ένα δεδομένο γονιδίωμα δεν συνεπάγεται άμεσα φαινότυπο ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά. Είναι σημαντικό να λαμβάνονται υπόψη οι συγκεκριμένοι μηχανισμοί AMR και ιδίως η απουσία/παρουσία μεταλλάξεων SNP που μεταδίδουν ανθεκτικότητα. Μια περίληψη των γονιδίων AMR που έχουν σχολιαστεί σε αυτό το γονιδίωμα και του αντίστοιχου μηχανισμού AMR παρέχεται στον πίνακα 3.7.4.5.

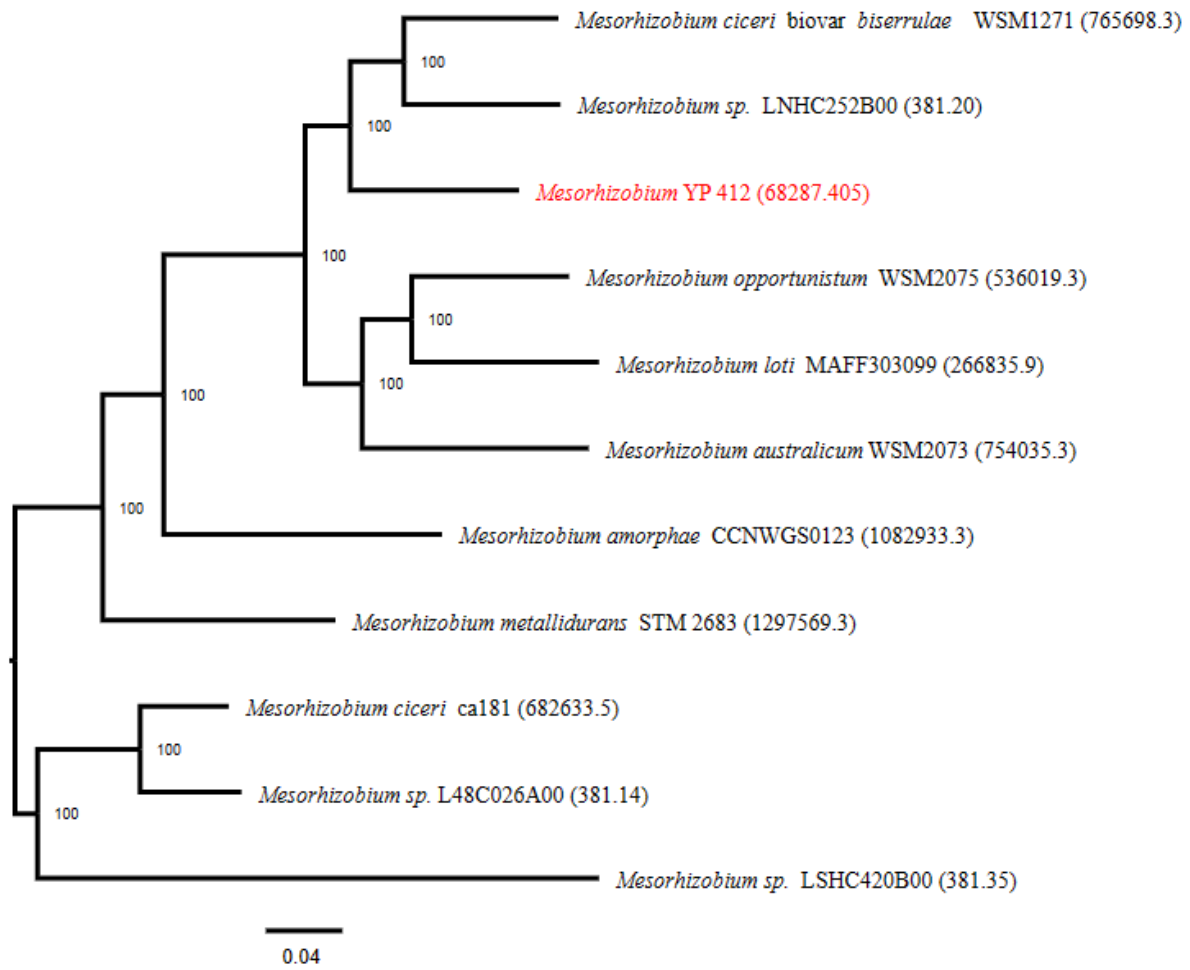
Πίνακας 3.7.4.5: Γονίδια αντιμικροβιακής ανθεκτικότητας.

AMR Mechanism	Genes
Antibiotic activation enzyme	KatG
Antibiotic inactivation enzyme	
Antibiotic target in susceptible species	Alr, Ddl, EF-G, EF-Tu, folA, Dfr, folP, gyrA, gyrB, inhA, fabI, Iso-tRNA, kasA, MurA, rho, rpoB, rpoC, S10p, S12p
Efflux pump conferring antibiotic resistance	MdtABC-TolC, TriABC-OpmH
Gene conferring resistance via absence	gidB
Protein altering cell wall charge conferring antibiotic resistance	GdpD, PgsA
Regulator modulating expression of antibiotic resistance genes	OxyR

Φαίνονται από πάνω προς τα κάτω: Αντιμικροβιακοί μηχανισμοί και τα αντίστοιχα γονίδια που εντοπίστηκαν στην *in silico* πρόβλεψη του γονιδιώματος

Φυλογενετική ανάλυση:

Το προσωπικό του Εθνικού Κέντρου Βιοτεχνολογικών Πληροφοριών (NCBI) επιλέγει και κατηγοριοποιεί χειροκίνητα τα γονιδιώματα αναφοράς και τα αντιπροσωπευτικά γονιδιώματα, τα οποία θεωρεί ότι είναι υψηλής ποιότητας και σημασίας για την ερευνητική κοινότητα. Το PATRIC παρέχει τα γονιδιώματα αναφοράς και τα αντιπροσωπευτικά γονιδιώματα και τα περιλαμβάνει στη φυλογενετική ανάλυση που αποτελεί μέρος της έκθεσης Comprehensive Genome Analysis. Τα πλησιέστερα γονιδιώματα αναφοράς και αντιπροσωπευτικά γονιδιώματα σε εντοπίστηκαν από το Mash/MinHash[15]. Από αυτά τα γονιδιώματα επιλέχθηκαν οι παγκόσμιες πρωτεϊνικές οικογένειες PATRIC (PGFams)[6] για τον προσδιορισμό της φυλογενετικής τοποθέτησης αυτού του γονιδιώματος. Οι πρωτεϊνικές αλληλουχίες από αυτές τις οικογένειες στοιχίστηκαν με το MUSCLE[17] και τα νουκλεοτίδια για κάθε μία από αυτές τις αλληλουχίες αντιστοιχίστηκαν στην πρωτεϊνική στοιχίση. Το κοινό σύνολο των ευθυγραμμίσεων αμινοξέων και νουκλεοτιδίων συνενώθηκε σε έναν πίνακα δεδομένων και χρησιμοποιήθηκε το RaxML[18] για την ανάλυση αυτού του πίνακα, ενώ χρησιμοποιήθηκε γρήγορο bootstrapping[19] για τη δημιουργία των τιμών υποστήριξης στο δέντρο (Εικόνα 3.7.4.2).



Εικόνα 3.7.4.2 Φυλλογενετικό δένδρο για το στέλεχος Y.P. 4.1.2

3.7.5 Γονίδια που σχετίζονται με την ανεκτικότητα στην αλατότητα

Ο ακόλουθος πίνακας αντιστοιχεί σε βιβλιογραφικά ευρήματα ανάλυση βιολογικών μονοπατιών των γονιδίων βακτηριοειδών που αυξάνονται όταν τα φυτά κοινών φασολιών εκτίθενται σε 300 mM NaCl. Τα συγκεκριμένα γονίδια υπερκφράζονται σε βακτηριοειδή σε συνθήκες στρες αλατότητας. Στον παρακάτω πίνακα η πρώτη στήλη αντιστοιχεί στις ομαδοποιήσεις ομόλογων γονιδίων (Database of Clusters of Orthologous Genes (COGs)) ενώ η δεύτερη στήλη αντιστοιχεί στα αντίστοιχα προϊόντα που σχετίζονται τα γονίδια. Όπως προκύπτει από την μελέτη των Wekesa C et al 2022.

Πίνακας 3.7.5.1 Γονίδια που σχετίζονται με την ανεκτικότητα στην αλατότητα:

Ομαδοποιήσεις ομόλογων γονιδίων	Μεταφορείς αμινοξέων και μεταβολισμού (Amino acids transport and metabolisms)	Ομαδοποιήσεις ομόλογων γονιδίων	Μεταφορείς ανόργανων ιόντων (Inorganic ion transport and metabolism)	Ομαδοποιήσεις ομόλογων γονιδίων	Μεταφορείς υδατανθράκων και μεταβολισμός (Carbohydrate transport and metabolism)
COG0014	Gamma-glutamyl phosphate reductase 1	COG0444	ABC-type dipeptide/oligopeptide/nickel transport system, ATPase component 12	COG0063	Predicted sugar kinase 1
COG0031	Cysteine synthase 1	COG0474	Cation transport ATPase 1	COG0448	ADP-glucose pyrophosphorylase 1
COG0075	Serine-pyruvate aminotransferase /archaeal aspartate aminotransferase 2	COG0477	Permeases of the major facilitator superfamily 1	COG0451	Nucleoside-diphosphate-sugar epimerases 4
COG0079	Histidinol-phosphate/aromatic aminotransferase and cobyrinic acid decarboxylase 2	COG0573	ABC-type phosphate transport system, permease component 1	COG0477	Permeases of the major facilitator superfamily 1
COG0160	4-aminobutyrate aminotransferase and related aminotransferases 1	COG0581	ABC-type phosphate transport system, permease component 1	COG0697	Permeases of the drug/metabolite transporter (DMT) superfamily 1
COG0403	Glycine cleavage system protein P (pyridoxal-binding), N-terminal domain 1	COG0600	ABC-type nitrate/sulfonate/bicarbonate transport system, permease component 3	COG0702	Predicted nucleoside-diphosphate-sugar epimerases 2

COG0404	Glycine cleavage system T protein (aminomethyltransferase) 1	COG0601	ABC-type dipeptide/oligopeptide/nickel transport systems, permease components 1	COG1070	Sugar (pentulose and hexulose) kinases 1
COG0410	ABC-type branched-chain amino acid transport systems, ATPase component 12	COG0609	ABC-type Fe ³⁺ -siderophore transport system, permease component 1	COG1082	Sugar phosphate isomerases/epimerases 1
COG0411	ABC-type branched-chain amino acid transport systems, ATPase component 12	COG0715	ABC-type nitrate/sulfonate/bicarbonate transport systems, periplasmic components 2	COG1086	Predicted nucleoside-diphosphate sugar epimerases 2
COG0436	Aspartate/tyrosine/aromatic aminotransferase 2	COG1116	ABC-type nitrate/sulfonate/bicarbonate transport system, ATPase component 11	COG1129	ABC-type sugar transport system, ATPase component 18
COG0444	ABC-type dipeptide/oligopeptide/nickel transport system, ATPase component 12	COG1117	ABC-type phosphate transport system, ATPase component 11	COG1134	ABC-type polysaccharide/polyol phosphate transport system, ATPase component 12
COG0458	Carbamoylphosphate synthase large subunit (split gene in MJ) 2	COG1118	ABC-type sulfate/molybdate transport systems, ATPase component 11	COG1172	Ribose/xylose/arabinose/galactoside ABC-type transport systems, permease components 1
COG0460	Homoserine dehydrogenase 1	COG1119	ABC-type molybdenum transport system, ATPase component/photo repair protein PhrA 12	COG1175	ABC-type sugar transport systems, permease components 2
COG0473	Isocitrate/isopropylmalate dehydrogenase 1	COG1120	ABC-type cobalamin/Fe ³⁺ -siderophores transport systems, ATPase components 11	COG1653	ABC-type sugar transport system, periplasmic component 1

COG0477	Permeases of the major facilitator superfamily 1	COG1121	ABC-type Mn/Zn transport systems, ATPase component 12	COG1820	N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase 3
COG0498	Threonine synthase 1	COG1122	ABC-type cobalt transport system, ATPase component 11	COG1879	ABC-type sugar transport system, periplasmic component 1
COG0509	Glycine cleavage system H protein (lipoate-binding) 1	COG1124	ABC-type dipeptide/oligopeptide/nickel transport system, ATPase component 12		
COG0559	Branched-chain amino acid ABC-type transport system, permease components 1	COG1135	ABC-type metal ion transport system, ATPase component 12		
COG0601	ABC-type dipeptide/oligopeptide/nickel transport systems, permease components 1	COG1173	ABC-type dipeptide/oligopeptide/nickel transport systems, permease components 2		
COG0626	Cystathionine beta-lyases/cystathionine gamma-synthases 3	COG1178	ABC-type Fe ³⁺ transport system, permease component 5		
COG0665	Glycine/D-amino acid oxidases (deaminating) 4	COG1785	Alkaline phosphatase 1		
COG0683	ABC-type branched-chain amino acid transport systems, periplasmic component 1	COG2011	ABC-type metal ion transport system, permease component 2		
COG0687	Spermidine/putrescine-binding periplasmic protein 1	COG2060	K ⁺ -transporting ATPase, A chain 1		

COG0697	Permeases of the drug/metabolite transporter (DMT) superfamily 1	COG2072	Predicted flavoprotein involved in K ⁺ transport 2		
COG0703	Shikimate kinase 1	COG2216	High-affinity K ⁺ transport system, ATPase chain B 1		
COG0747	ABC-type dipeptide transport system, periplasmic component 1	COG2217	Cation transport ATPase 1		
COG0765	ABC-type amino acid transport system, permease component 2	COG2223	Nitrate/nitrite transporter 1		
COG0834	ABC-type amino acid transport/signal transduction systems, periplasmic component/domain 2	COG2382	Enterochelin esterase and related enzymes 1		
COG1045	Serine acetyltransferase 1	COG3221	ABC-type phosphate/phosphonate transport system, periplasmic component 1		
COG1063	Threonine dehydrogenase and related Zn-dependent dehydrogenases 1	COG3420	Nitrous oxidase accessory protein 1		
COG1104	Cysteine sulfinate desulfinate/cysteine desulfurase and related enzymes 1	COG3454	Metal-dependent hydrolase involved in phosphonate metabolism 2		
COG1124	ABC-type dipeptide/oligopeptide/nickel transport system, ATPase component 12	COG3624	Uncharacterized enzyme of phosphonate metabolism 1		

COG1125	ABC-type proline/glycine betaine transport systems, ATPase components 11	COG3638	ABC-type phosphate/phosphonate transport system, ATPase component 12		
COG1126	ABC-type polar amino acid transport system, ATPase component 12	COG3639	ABC-type phosphate/phosphonate transport system, permease component 2		
COG1167	Transcriptional regulators containing a DNA-binding HTH domain and an aminotransferase domain (MocR family) and their eukaryotic orthologs 2	COG3696	Putative silver efflux pump 4		
COG1168	Bifunctional PLP-dependent enzyme with beta-cystathionase and maltose regulon repressor activities 1	COG3703	Uncharacterized protein involved in cation transport 1		
COG1171	Threonine dehydratase 1	COG4100	Cystathionine beta-lyase family protein involved in aluminum resistance 1		
COG1173	ABC-type dipeptide/oligopeptide/nickel transport systems, permease components 2	COG4107	ABC-type phosphonate transport system, ATPase component 12		
COG1174	ABC-type proline/glycine betaine transport systems, permease component 2	COG4148	ABC-type molybdate transport system, ATPase component 12		

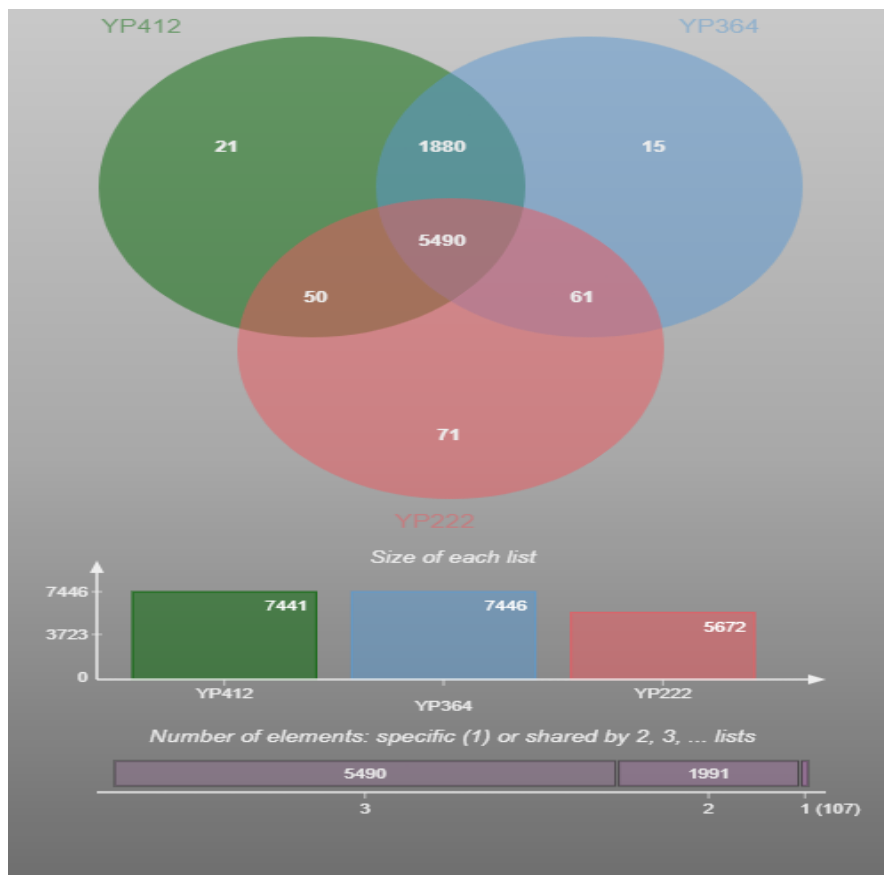
COG1176	ABC-type spermidine/putrescine transport system, permease component I 2	COG4149	ABC-type molybdate transport system, permease component 2		
COG1177	ABC-type spermidine/putrescine transport system, permease component II 2	COG4521	ABC-type taurine transport system, periplasmic component 1		
COG1231	Monoamine oxidase 2	COG4525	ABC-type taurine transport system, ATPase component 11		
COG1748	Saccharopine dehydrogenase and related proteins 1	COG4555	ABC-type Na ⁺ transport system, ATPase component 12		
COG1897	Homoserine trans-succinylase 1	COG4559	ABC-type hemin transport system, ATPase component 12		
COG1921	Selenocysteine synthase [seryl-tRNA ^{Ser} selenium transferase] 2	COG4604	ABC-type enterochelin transport system, ATPase component 11		
COG1984	Allophanate hydrolase subunit 2 1	COG4605	ABC-type enterochelin transport system, permease component 1		
COG2008	Threonine aldolase 1	COG4606	ABC-type enterochelin transport system, permease component 1		
COG2171	Tetrahydrodipicolinate N-succinyltransferase 1	COG4615	ABC-type siderophore export system, fused ATPase and permease components 10		
COG2303	Choline dehydrogenase and related flavoproteins 2	COG4778	ABC-type phosphonate transport system, ATPase component 11		

COG2873	O-acetylhomoserine sulfhydrylase 2	COG4779	ABC-type enterobactin transport system, permease component 1		
COG3075	Anaerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1	COG4986	ABC-type anion transport system, duplicated permease component 4		
COG3185	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase and related hemolysins 1				
COG3842	ABC-type spermidine/putrescine transport systems, ATPase components 11				
COG3844	Kynureninase 1				
COG3977	Alanine-alpha-ketoisovalerate (or valine-pyruvate) aminotransferase 1				
COG4160	ABC-type arginine/histidine transport system, permease component 1				
COG4161	ABC-type arginine transport system, ATPase component 11				
COG4166	ABC-type oligopeptide transport system, periplasmic component 1				

COG4175	ABC-type proline/glycine betaine transport system, ATPase component 12				
COG4176	ABC-type proline/glycine betaine transport system, permease component 2				
COG4177	ABC-type branched-chain amino acid transport system, permease component 1				
COG4215	ABC-type arginine transport system, permease component 1				
COG4597	ABC-type amino acid transport system, permease component 1				
COG4598	ABC-type histidine transport system, ATPase component 11				
COG4608	ABC-type oligopeptide transport system, ATPase component 12				
COG4992	Ornithine/acetylornithine aminotransferase 1				

3.7.6 Σύγκριση γωνιδιομάτων με χρήση του εργαλείου OrthoVenn 3

Με τη χρήση του διαδικτυακού εργαλείου OrthoVenn 3 μελετήθηκαν οι ομαδοποιήσεις των πρωτεϊνών όπως προβλέφθηκαν από την *in silico* πρόβλεψη γονιδιώματος. Πιο συγκεκριμένα με την *in silico* πρόβλεψη, προβλέφθηκαν τα γονίδια που υπάρχουν στα γονιδιώματα των τριών μελετώμενων στελεχών. Εξήχθησαν οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούν αυτά και ομαδοποιήθηκαν. Οι εκάστοτε ομαδοποιήσεις συγκρίθηκαν μεταξύ των στελεχών και προέκυψε το ακόλουθο διάγραμμα.



Εικόνα 3.7.6.2 Βένιο Διάγραμμα που φανερώνει τις κοινές προβλεπόμενες πρωτεϊνικές ομάδες (protein clusters) των τριών μελετώμενων στελεχών. Με πράσινο χρώμα φαίνεται το στέλεχος Y.P.4.1.2. και οι αντίστοιχες πρωτεΐνες του. Με κόκκινο χρώμα το στέλεχος Y.P.2.2.2. και οι αντίστοιχες πρωτεΐνες του. Με μπλε χρώμα το στέλεχος Y.P.3.6.4. και οι αντίστοιχες πρωτεΐνες του.

Στο επίμετρο βρίσκεται αναλυτικός πίνακας με τις ομαδοποιήσεις των προβλεπόμενων πρωτεϊνών και τα εκάστοτε στελέχη που εμφανίστηκαν αυτές.

3.7.7 Αξιοσημείωτες πρωτεΐνες που προβλέφθηκαν

Στα Υ.Ρ.2.2.2 & Υ.Ρ.4.1.2

Η αφυδρογονάση των D-αμινοξέων (dadA):

Η αφυδρογονάση των D-αμινοξέων (dadA) είναι ένα ένζυμο που εμπλέκεται στον καταβολισμό των D-αμινοξέων, τα οποία είναι εναντιομερή των πιο κοινών L-αμινοξέων. Αν και υπάρχουν περιορισμένα άμεσα στοιχεία που συνδέουν τη DADA με την ανοχή στο αλάτι, ο ρόλος της στο μεταβολισμό των αμινοξέων υποδηλώνει πιθανές επιπτώσεις στις κυτταρικές αποκρίσεις στο στρες. Τα αμινοξέα είναι απαραίτητα για διάφορες κυτταρικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της οσμωρύθμισης και της ανοχής στο στρες. Ως εκ τούτου, ένζυμα όπως η DADA, τα οποία συμμετέχουν στο μεταβολισμό των αμινοξέων, ενδέχεται να συμβάλλουν έμμεσα στην ανοχή στο αλάτι ρυθμίζοντας την κυτταρική δεξαμενή αμινοξέων και των παραγώγων τους. Επιπλέον, ορισμένες μελέτες έχουν υποδείξει ότι τα ίδια τα D-αμινοξέα μπορεί να έχουν ρόλο στις αποκρίσεις στο στρες και στην οσμωρύθμιση στα βακτήρια, αν και απαιτείται περαιτέρω έρευνα για την πλήρη διαλεύκανση των σχετικών μηχανισμών. Συνολικά, αν και η συγκεκριμένη σχέση μεταξύ της DADA και της ανοχής στο αλάτι απαιτεί περαιτέρω έρευνα, είναι εύλογο ότι τα ένζυμα που εμπλέκονται στον μεταβολισμό των αμινοξέων παίζουν ρόλο στις βακτηριακές αποκρίσεις σε περιβαλλοντικούς στρεσογόνους παράγοντες, όπως οι υψηλές συγκεντρώσεις αλατιού. (Naganuma Takeshi et al 2018)

Στο Υ.Ρ.4.1.2

Πορίνη Omp2a:

Η πορίνη Omp2a είναι μια πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης που βρίσκεται σε διάφορα βακτηριακά είδη. Ενώ ο συγκεκριμένος ρόλος της πορίνης Omp2a στην αλατότητα μπορεί να διαφέρει ανάλογα με το συγκεκριμένο βακτήριο και το περιβαλλοντικό πλαίσιο, οι πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης, συμπεριλαμβανομένων των πορινών, μπορούν να διαδραματίσουν σημαντικούς ρόλους στη βακτηριακή προσαρμογή σε οσμωτικούς στρες, συμπεριλαμβανομένου του αλατώδους στρες.

Οι πορίνες είναι ενσωματωμένες πρωτεΐνες της μεμβράνης που δημιουργούν κανάλια στην εξωτερική μεμβράνη των μονοκύτταρων βακτηρίων, επιτρέποντας την παθητική διέλευση μικρών μορίων, συμπεριλαμβανομένων ιόντων και θρεπτικών συστατικών, απέναντι στο εσωτερικό του κυττάρου. Αυτά τα κανάλια ρυθμίζουν τη διαπερατότητα της εξωτερικής μεμβράνης, επηρεάζοντας την είσοδο ιόντων και άλλων διαλυμάτων στο βακτηριακό κύτταρο.

Στο πλαίσιο της ανεκτικότητας στην αλατότητα, πορίνες όπως η Omp2a μπορούν να επηρεάσουν την εισροή ιόντων νατρίου (Na⁺) και άλλων οσμολυτών, βοηθώντας στη διατήρηση της ομοιοστατικής ισορροπίας και της κυτταρικής ομοιόστασης υπό συνθήκες υψηλής αλατότητας. Επιπλέον, ορισμένες πορίνες μπορεί να διευκολύνουν τη διάχυση συμβατών οσμολυτών, όπως η γλυκίνη βεταΐνη ή η προλίνη, οι οποίοι δρουν ως οσμοπροστατευτικοί παράγοντες, βοηθώντας τα βακτήρια να αντιμετωπίσουν το οσμωτικό στρες.

Ορισμένες μελέτες έχουν δείξει ότι τα επίπεδα έκφρασης και οι ιδιότητες των πορινών μπορούν να ρυθμιστούν σε απάντηση σε αλλαγές στην περιβαλλοντική οσμικότητα, συμπεριλαμβανομένης της αύξησης αλατότητας. Για παράδειγμα, τα βακτήρια μπορεί να αυξήσουν ορισμένες πορίνες υπό συνθήκες υψηλής αλατότητας για να βελτιώσουν την εισροή οσμοπροστατευτικών ή να μειώσουν την έλευση τοξικών ιόντων.

Ενώ οι συγκεκριμένες μελέτες για την πορίνη Omp2a και την αλατώδη ανοχή μπορεί να είναι περιορισμένες, η κατανόηση της λειτουργίας της ως πορίνη και των πιθανών συμβολών της στις

μηχανισμούς αντιμετώπισης του στρες αλατότητας μπορεί να παράσχει ενδιαφέροντα στοιχεία για το ρόλο της στην ανοχή στο αλάτι. Περαιτέρω έρευνα μπορεί να είναι απαραίτητη για να διευκρινιστούν τα συγκεκριμένα μηχανισμοί μέσω των οποίων η πορίνη Omp2a επηρεάζει τις βακτηριακές αντιδράσεις στο στρες αλατότητας. (Paquet JY et al, 2001)

Στο Υ.Ρ.2.2.2

Αλομυκίνη (Halomucin):

Η αλομυκίνη, μια μεγάλη γλυκοπρωτεΐνη, αντιπροσωπεύει μια σημαντική προσαρμογή στους αλόφιλους μικροοργανισμούς, ιδιαίτερα διαδεδομένη σε αλόφιλα αρχαία όπως το *Haloferax volcanii* και το *Haloquadratum walsbyi*, τα οποία ζουν σε ακραία αλατούχα περιβάλλοντα όπως οι αλμυρές λίμνες και οι αλυκές. Δομικά, η αλομυκίνη διακρίνεται για το σημαντικό μοριακό της βάρος και την εκτεταμένη γλυκοζυλίωσή της, προσδίδοντάς της μοναδικές ιδιότητες απαραίτητες για την επιβίωσή της σε τέτοιες ακραίες συνθήκες. Ο ρόλος της περιστρέφεται κυρίως γύρω από τη διατήρηση της ενυδάτωσης και την κυτταρική προστασία. Η αλομυκίνη σχηματίζει μια ενυδατωμένη μήτρα γύρω από τα κύτταρα, χρησιμεύοντας ως φραγμός έναντι της ξήρανσης και του οσμωτικού στρες, που είναι ζωτικής σημασίας για την ακεραιότητα και τη λειτουργία των κυττάρων. Αυτός ο προστατευτικός μηχανισμός είναι ζωτικής σημασίας για την επιβίωση των αλόφιλων μικροοργανισμών εν μέσω υψηλών συγκεντρώσεων αλάτων. Επιπλέον, οι πιθανές εφαρμογές της αλομυκίνης επεκτείνονται πέρα από το ρόλο της στη βιολογία των ακραιόφιλων. Οι μοναδικές ιδιότητές της την καθιστούν πολλά υποσχόμενο υποψήφιο για διάφορες βιοτεχνολογικές εφαρμογές, ιδίως στην ανάπτυξη βιοϋλικών, όπου οι ιδιότητες ενυδάτωσης της θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν για φαρμακευτικούς και καλλυντικούς σκοπούς. Παρά τη σημασία της, η αλομυκίνη παραμένει σχετικά ανεπαρκώς μελετημένη, γεγονός που οδηγεί σε περαιτέρω έρευνα της δομής, της λειτουργίας και των πιθανών εφαρμογών της στη βιοτεχνολογία και όχι μόνο. (Bolhuis et. al 2006)

Quaternary ammonium compound efflux MFS transporter (qacA):

Ο μεταφορέας MFS εκροής τεταρτοταγών ενώσεων αμμωνίου είναι ένας τύπος μεμβρανικής πρωτεΐνης που απαντάται στα βακτήρια και ανήκει συγκεκριμένα στην υπεροικογένεια των μεγάλων διευκολυντών (MFS). Αυτός ο μεταφορέας εμπλέκεται στην εκροή τεταρτοταγών ενώσεων αμμωνίου (QAC), οι οποίες χρησιμοποιούνται συνήθως ως απολυμαντικά και αντισηπτικά. Αν και υπάρχουν περιορισμένα άμεσα στοιχεία που συνδέουν αυτόν τον μεταφορέα με την ανοχή στο στρες, ο ρόλος του στην άντληση τοξικών ενώσεων από τα βακτηριακά κύτταρα υποδηλώνει μια πιθανή έμμεση συμβολή στην ανοχή στο στρες. Τα βακτήρια χρησιμοποιούν αντλίες εκροής ως μέρος των μηχανισμών άμυνάς τους έναντι επιβλαβών ουσιών, συμπεριλαμβανομένων των αντιμικροβιακών παραγόντων και των περιβαλλοντικών στρεσογόνων παραγόντων. Ωστόσο, απαιτούνται ειδικές μελέτες για την περαιτέρω κατανόηση της συμμετοχής του μεταφορέα εκροής τεταρτοταγών ενώσεων αμμωνίου MFS στους μηχανισμούς ανοχής στο στρες στα βακτήρια. (Gaurav A et. Al 2023)

Spermidine/putrescine transport system permease protein PotB:

Η πρωτεΐνη PotB του συστήματος μεταφοράς σπερμιδίνης/πουτρεσκίνης είναι συστατικό ενός συστήματος μεταφορέα που απαντάται στα βακτήρια και είναι υπεύθυνο για την πρόσληψη πολυαμινών όπως η σπερμιδίνη και η πουτρεσκίνη. Αυτές οι πολυαμίνες είναι απαραίτητες για διάφορες κυτταρικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της κυτταρικής ανάπτυξης, της διαφοροποίησης και των αποκρίσεων στο στρες. Το PotB συμμετέχει στη διευκόλυνση της μετακίνησης της σπερμιδίνης και της πουτρεσκίνης διαμέσου της βακτηριακής μεμβράνης, επιτρέποντας στο κύτταρο να αποκτήσει αυτά τα σημαντικά μόρια από το

εξωτερικό περιβάλλον. Αυτό το σύστημα μεταφοράς είναι ζωτικής σημασίας για τη βακτηριακή φυσιολογία και την προσαρμογή στις μεταβαλλόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες.(Holland et al 1999). Εμφανίζεται στον πίνακα που προέκυψε από τους Wekesa C et al 2022 με τα γονίδια που υπερκωδώνονται σε βακτηριοειδή που δομούν φυμάτια κάτω από συνθήκες καταπόνησης αλατότητας.

Και στα δύο ανεκτικά στελέχη Υ.Ρ.2.2.2 και Υ.Ρ.4.1.2 εμφανίστηκαν αρκετοί εκπρόσωποι ABC μεταφορέων που έχει δειχθεί από την βιβλιογραφία πως ενδέχεται σαν οικογένεια να βοηθάει στην προσαρμογή σε περιβαλλοντικές καταπονήσεις. Οι οποίοι εκπρόσωποι δεν εμφανίζονται στο ευαίσθητο Υ.Ρ 3.6.4.

4. Συζήτηση

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε μελέτη πλήθους βακτηριακών στελεχών τα οποία είχαν προηγουμένως απομονωθεί από φυτά *Robinia pseudoacacia*. Η απομόνωση των βακτηριακών στελεχών από τα φυμάτια των συγκεκριμένων δένδρων, η εξαγωγή γενωμικού DNA και το καθάρισμα αυτού είχε προηγηθεί σε άλλο πείραμα πτυχιακής στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών (Παρασκάκης 2020). Η παρούσα εργασία είχε σαν αρχικό σκοπό να βρεθούν ανθεκτικά στην αλατότητα στελέχη από τα φυμάτια *R.pseudoacacia* καθώς και να ταυτοποιηθούν αυτά σε επίπεδο γένους. Να δοκιμασθεί η ικανότητα συμβίωσης τους με τα φυτά *R.pseudoacacia*, να μελετηθεί ο φαινότυπος τους εκάστοτε φυταρίου φαινοτυπικά και να αξιολογηθεί η δραστικότητα της νιτρογενάσης του κάθε στελέχους φαινοτυπικά. Ακολούθως να χαρακτηρισθούν πλήρως με τεχνικές αλληλούχισης νεας γενεάς δυο ανθεκτικά στην αλατότητα στελέχη και να συγκριθούν μεταξύ τους σε γονιδιακό επίπεδο. Συνεπώς χρησιμοποιήθηκαν τα προηγουμένως απομονωμένα από φυμάτια ριζόβια καθώς και το γενωμικό τους DNA. Τα αποτελέσματα της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας αναδεικνύουν την ετερογένεια που εμφανίζουν συμβιωτικά βακτηριακά στελέχη με το φυτό ψευδοακακία. Η απομόνωση, ο φαινοτυπικός και μοριακός χαρακτηρισμός αυτών των στελεχών μπορεί να βοηθήσει σε μια αειφόρα αξιοποίηση του συγκεκριμένου είδους για καλλιέργεια, με τα πλεονεκτήματα που προαναφέρονται στην εισαγωγή. Η μελέτη της ανθεκτικότητας σε συνθήκες αλατότητας των βακτηρίων που σχηματίζουν συμβιωτική σχέση με το φυτό, μπορεί να αναδείξει πολύπλοκους μηχανισμούς ανθεκτικότητας για το πολυετές αυτό φυτό, μηχανισμοί οι οποίοι μπορούν να το βοηθήσουν να ανταπεξέλθει σε δύσκολα περιβάλλοντα. Η ξηρασία και η αλατότητα όπως είδαμε και στην εισαγωγή της εργασίας αυτής, είναι από τις κυριότερες περιβαλλοντικές καταπονήσεις στα φυτά στις μέρες μας, και έχουν σαν αποτέλεσμα αλλαγές στις φυσιολογικές, βιοχημικές καθώς και μοριακές διεργασίες των φυτών συνεπώς και στην αγροτική παραγωγή. Η εκτενής χρήση χημικών λιπασμάτων, με σκοπό να προσπελαστούν αυτά τα εμπόδια και αναπτυχθούν επιτυχώς τα φυτά σε περιβάλλοντα δυσμενή για αυτά, αποτελεί σοβαρό κίνδυνο για την υγεία των ανθρώπων καθώς και για τις ισορροπίες του περιβάλλοντος. (Fiodor A et al 2021).

Τα στελέχη που έχουν ανθεκτικότητα στην αλατότητα και ταυτόχρονα σχηματίζουν φυμάτια και αζωτοδεσμεύουν, μπορούν δυνητικά να έχουν μεγάλη χρησιμότητα στην ανθρωπότητα και την φύση. Υπάρχει η δυνατότητα χρήσης τέτοιων στελεχών σε σκευάσματα βιο-λιπασμάτων (biofertilizers). Έχει δειχθεί από μελέτες (José D. Flores-Félix et al 2013, M. A. Baset Mia et al 2010) πως ανθεκτικά ριζόβια βακτήρια που αζωτοδεσμεύουν μπορούν να ενισχύσουν την ανάπτυξη των φυτών όπως και την ποσότητα αζώτου και φωσφόρου στα φυτά που αυτά εφαρμόζονται. Ακόμα δεδομένου ότι τα ριζόβια εμφανίζουν καλύτερη επιβιωσιμότητα σε περιβαλλοντικές καταπονήσεις από τα φυτά ξενιστές (Cardoso et al 2015) τους μπορούν να διευκολύνουν την ανάπτυξη των φυτών σε δυσμενέστερα περιβάλλοντα καταπονήσεων, όπως αυτό της αυξημένης αλατότητας. Ορισμένα ανθεκτικά σε αλατότητα βακτηριακά στελέχη μπορούν να παράγουν ορμόνες, οσμωπροστατευτικές ενώσεις και δευτερογενείς μεταβολήτες, συνεισφέροντας θετικά στην συμβιωτική σχέση κάτω από συνθήκες υψηλής αλατότητας. Παρόλα αυτά πρέπει να ληφθεί υπόψιν πως η επίδραση που δυνητικά έχουν τα ριζόβια βακτήρια σαν βιολιπάσματα είναι ένα πολυπαραγοντικό ζήτημα που δεν εξαρτάται μονάχα από την κατάσταση του εδάφους και των θρεπτικών. Για αυτό και πρέπει να μελετηθεί πιο συγκεκριμένα και ειδικά το ζήτημα της επίδρασης των μικροοργανισμών με ποικιλία χαρακτηριστικών στην καταπολέμηση της επίδρασης της αλατότητας.

Όσον αφορά την ανεκτικότητα σε αλατότητα, εξαιρετικά ανεκτικά ριζόβια στελέχη έχουν δειχθεί ότι μπορούν να αναπτυχθούν μέχρι και σε συγκέντρωση 10.8% NaCl ($IC_{50} < 10.8\%$), σε γενικές γραμμές τα ανεκτικά ριζόβια επιβιώνουν επαρκώς σε συνθήκες αλατότητας μέχρι και τα 3.6% NaCl ($1.5\% < IC_{50} < 3.6\%$), ενώ τα συνήθη μετρίως ανεκτικά ριζόβια βακτήρια αναπτύσσονται μέχρι και σε συγκέντρωση 1.5% NaCl. Ενώ στελέχη που έχουν $IC_{50} < 0.5\%$ NaCl θεωρούνται ευαίσθητα. Να σημειωθεί εδώ πως η ανεκτικότητα ποικίλει με βάση την περιοχή συλλογής των φυματίων. (Cardoso et al 2015). Στην εργασία μου τα φυμάτια ήταν όλα από την ίδια περιοχή οπότε δεν περιμέναμε τρομερές διαφορές στην ανεκτικότητα στο σύνολο των δειγμάτων. Εντούτοις παρατηρήθηκε μια κάποια ποικιλομορφία καθώς είχαμε αρκετά ευαίσθητα στελέχη και αρκετά μετρίως ανθεκτικά, καθώς και πολύ λίγα ανθεκτικά στο σύνολο των 48 συνολικών στελεχών ΥΡ από τα οποία επιλέχθηκαν δειγματικά 6 για περαιτέρω μελέτη. (Να σημειωθεί εδώ πως η επιλογή έγινε με κριτήριο την δυνητική ανθεκτικότητα σε βαρέα μέταλλα). Τα στελέχη που επιλέξαμε ανήκουν με βάση το φυλλογενετικό δένδρο που κατασκευάστηκε για τα 16S rRNA στα α-πρωτεοβακτήρια και ειδικότερα στο γένος *Mesorhizobium*. Η διαφωνία μεταξύ των 16S δένδρου και του *nifH* είναι σύμφωνη με την άποψη ότι η ποικιλομορφία στα γένη αυτά των ριζοβίων στελεχών μπορεί να οφείλεται στην οριζόντια μεταφορά γονιδίων ή/και στον ανασυνδοιασμό μεταξύ διαφορετικών ριζοβιακών στελεχών (Kumar et al. 2015; Shamseldin et al. 2014; Xu et al. 2015; Youseif et al. 2014). Γενικότερα η σύγκριση των *nifH* αλληλουχιών δεν φανερώνει φυλλογενετική σχέση αλλά περιβαλλοντική κατανομή εξαιτίας των μηχανισμών οριζόντιας μεταφοράς και ανασυνδιασμού. Τα επιλεγμένα στελέχη χαρακτηρίζονται από υπερευαίσθητα (ΥΡ 3.6.4), μέτριας ανθεκτικότητας (ΥΡ 1.3.1, ΥΡ 2.2.2, ΥΡ 5.3.3, ΥΡ 5.4.3) και ανθεκτικά (ΥΡ 4.1.2). (με βάση την μελέτη των Cardoso et al 2015). Σε άλλες μελέτες δείχνεται πως ανάπτυξη σε ποσοστό μέχρι και 2% NaCl δεν φανερώνει ανθεκτικότητα αλλά χαρακτηρίζεται φυσιολογική. Ένας ακόμα παράγοντας που πρέπει να ληφθεί υπόψη για να χαρακτηριστεί το κάθε στέλεχος αναφορικά με την ικανότητά του να επιβιώνει σε συγκεντρώσεις αλάτων συγκριτικά με τα υπόλοιπα της γεωγραφικής περιοχής του και της εποχής που απομονώθηκε καθώς έχει δειχθεί τοποειδική και εποχικά εξαρτώμενη ποικιλία στην ανεκτικότητα. Στην μελέτη του Cardoso και συνεργατών του 2015 για το Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, Campus de Santiago, Portugal φάνηκε πως η ανεκτικότητα στην αλατότητα των πληθυσμών των ριζοβίων βακτηρίων έχει μεγάλη ποικιλία καθώς υπήρχε διαφορετική ανεκτικότητα σε στελέχη από την νότια Πορτογαλία και την Βόρεια, όπως επίσης η ανεκτικότητα ήταν διαφορετική αναλόγως την εποχή του χρόνου που συλλέχθηκαν τα δείγματα (αργά την άνοιξη ή αργά το φθινόπωρο) με αργά την άνοιξη- αρχές καλοκαιριού να εμφανίζεται μεγαλύτερη ανεκτικότητα στον πληθυσμό. Το γεγονός αυτό φαίνεται να υποδηλώνει την αναλογία στην καταπόνηση αλατότητας και ξηρασίας. Η ανεκτικότητα στην αλατότητα μπορεί να επαχθεί μόνο από αλλαγές στα μεταβολικά δίκτυα.

Αναφορικά με τα γονίδια που εμφανίζονται στα στελέχη που μελετήσαμε, παρατηρήσαμε με τις τεχνολογίες αλληλούχισης νέας γενεάς και τη χρήση της συγκριτικής γονιδιοματικής ανάλυσης την ύπαρξη ορισμένων γονιδίων που μπορούν να προσδώσουν στα ριζόβια βακτήρια, και εν συνεχεία και στα φυτά ξενιστές τους, ανεκτικότητα σε περιβαλλοντικό στρες αλατότητας. Να σημειωθεί σε αυτό το σημείο πως η ύπαρξη ή η μη ύπαρξη τέτοιων γονιδίων δεν σημαίνει απαραίτητα και την έκφρασή τους. Σίγουρα είναι σημαντικό εύρημα το γεγονός ότι υπάρχουν στο γονιδίωμα των ανεκτικών βακτηρίων δυνητικά ωσμοπροστατευτικά γονίδια τα οποία δεν εμφανίζονται στο ευαίσθητο στέλεχος. Από τα γονίδια που μελετήθηκαν στην έρευνα των Wekesa C, et al το 2022 που ρυθμίστηκαν προς τα πάνω, τα 92,4% μπορούσαν να αντιστοιχιστούν στις συστάδες ορθόλογων ομάδων (COGs). Οι πιο εμπλουτισμένες COGs ήταν αυτές που εμπλέκονται στην παραγωγή ενέργειας, τον μεταβολισμό και τη μεταφορά αμινοξέων,

υδατανθράκων και ανόργανων ιόντων. Ομοίως φαίνεται να αντιστοιχούν σε ίδια COGs και τα γονίδια που υπάρχουν στα ανεκτικά στελέχη της παρούσας εργασίας. Τα αποτελέσματα τις παρούσας εργασίας μπορούν να αποτελέσουν την βάση εκτενέστερης ανάλυσης και μελέτης σε επίπεδο γονιδιακής έκφρασης. Δίνοντας έτσι μια κατεύθυνση προσέγγισης της «μοριακής αλήθειας» της ανεκτικότητας ωσμωτικού στρες στο βακτηριδιακό επίπεδο.

Όσον αφορά την παρούσα πτυχιική εργασία και την περαιτέρω εξέλιξή της, φαίνεται αναγκαίο για να συζητηθούν ασφαλή και σφαιρικά συμπεράσματα να γίνουν και άλλες πειραματικές προσεγγίσεις. Όπως για παράδειγμα την συνδυαστική μελέτη της απόκρισης σε ξηρασία και αλατότητα ή και την δοκιμή ριζοβίων στελεχών σε ακόμα μεγαλύτερη ποικιλία καταπονήσεων (πχ σε βαρέα μέταλλα ή σε ποικιλία pH). Ενδιαφέρον θα είχε ακόμα η συγκριτική μελέτη ριζοβίων από ποικιλία περιοχών και εποχών. Μια ακόμα μελλοντική προσέγγιση, όπως αναφέρεται και παραπάνω, είναι η συγκριτική τρανσκριπτομική ανάλυση των στελεχών αυτών ούτως ώστε να διαλευκανθεί με βεβαιότητα ποιος μηχανισμός ή ο συνδυασμός ποιων μηχανισμών είναι τελικά αυτός που επιτρέπει στα βακτηροειδή να επιβιώνουν και να λειτουργούν σε εδάφη με αυξημένη αλατότητα. Τέλος η μελέτη της απόκρισης ολόκληρου του συμβιωτικού συστήματος βακτηρίων-φυτού σε καταπονήσεις ούτως ώστε να δούμε την ποιοτική και ποσοτική συνεισφορά των ανεκτικών ριζοβίων στην συμβιωτική σχέση. (Farissi, et al 2014).

5. Βιβλιογραφία

Ελληνική Βιβλιογραφία

- Madigan M., Martinko J., Parker J., 2005. ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ, ΤΟΜΟΣ ΙΙ, ΚΕΦ.19. Μικροβιακά ενδιαιτήματα, κύκλοι θρεπτικών ουσιών, αλληλεπιδράσεις με φυτά και ζώα. ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΕΣ ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΚΡΗΤΗΣ
- Taiz L., Zeiger E., 2013. ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΦΥΤΩΝ, ΚΕΦ.12. Αφομοίωση ανόργανων θρεπτικών στοιχείων. Εκδόσεις Utoria ΕΠΕ.
- Αγγελής, 2007. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ, ΚΕΦ.7. Ο μικροβιακός κόσμος. ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΑΘ.ΣΤΑΜΟΥΛΗΣ
- Παρασκάκης Παναγιώτης πτυχιακή μελέτη «ΜΟΡΙΑΚΗ ΠΟΙΚΙΛΟΜΟΡΦΙΑ ΚΑΙ ΦΥΛΟΓΕΝΕΙΑ ΣΥΜΒΙΩΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΤΟ ΨΥΧΑΝΘΕΣ *Robinia pseudoacacia* » Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών 2020

Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία

1. Abdul Qados, A. M. S., & Mofteh, A. E. (2014). Influence of Silicon and Nano-Silicon on Germination, Growth and Yield of Faba Bean (*Vicia faba* L.) Under Salt Stress Conditions. *Journal of Experimental Agriculture International*, 5(6), 509–52https://doi.org/10.9734/AJEA/2015/14109
2. Ayami Shiraiishi, Masabumi Komatsu, Norihisa Matsushita & Taizo Hogetsu (2011) Genetic diversity and spatial distribution of rhizobial bacteria nodulating on black locust (*Robinia pseudoacacia*) rhizospheres, *Soil Science and Plant Nutrition*, 57:6, 765-774, DOI: 10.1080/00380768.2011.629372
3. Benhizia, Yacine, et al. "Gamma proteobacteria can nodulate legumes of the genus *Hedysarum*." *Systematic and Applied Microbiology* 27.4 (2004): 462-468.
4. Bolhuis, Henk & Palm, Peter & Wende, Andy & Falb, Michaela & Rampp, Markus & Rodriguez-Valera, Francisco & Pfeiffer, Friedhelm & Oesterhelt, Dieter. (2006). The genome of the square archaeon *Haloquadratum walsbyi*: Life at the limits of water activity. *BMC genomics*. 7. 169. 10.1186/1471-2164-7-169.
5. Bouzroud, S., Henkrar, F., Fahr, M. *et al.* Salt stress responses and alleviation strategies in legumes: a review of the current knowledge. *3 Biotech* 13, 287 (2023). https://doi.org/10.1007/s13205-023-03643-7
6. Cardoso, P., Freitas, R., & Figueira, E. (2015). Salt tolerance of rhizobial populations from contrasting environmental conditions: understanding the implications of climate change. *Ecotoxicology*, 24(1), 143–152. https://doi.org/10.1007/s10646-014-1366-8
7. Chandna, Ruby, M. M. Azooz, and Parvaiz Ahmad. "Recent advances of metabolomics to reveal plant response during salt stress." *Salt stress in plants* (2013): 1-14.
8. Checcucci, A., diCenzo, G. C., Perrin, E., Bazzicalupo, M., & Mengoni, A. (2019). Genomic Diversity and Evolution of Rhizobia. In *Microbial Diversity in the Genomic Era* (pp. 37–46). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814849-5.00003-4

9. Chunzhao Zhao, Heng Zhang, Chunpeng Song, Jian-Kang Zhu, Sergey Shabala, Mechanisms of Plant Responses and Adaptation to Soil Salinity, The Innovation, Volume 1, Issue 1, 2020, 100017, ISSN 2666-6758, <https://doi.org/10.1016/j.xinn.2020.100017>
10. Cierjacks, Arne, et al. "Biological flora of the British Isles: Robinia pseudoacacia." *Journal of ecology* 101.6 (2013): 1623-1640..
11. Converse, C. K., and TunyaLee Martin. "Element stewardship abstract for Robinia pseudoacacia (Black Locust)." Edizione su sito internet <http://www.imapinvasives.org/GIST/ESA/esapages/robipseu.html>, anno (1984).
12. Das, P., Kumar Behera, B., Kumar Meena, D., Afrin Azmi, S., Chatterjee, S., Meena, K., & Prakash Sharma, A. (2015). Salt stress tolerant genes in halophilic and halotolerant bacteria: Paradigm for salt stress adaptation and osmoprotection. In *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* (Vol. 4, Issue 1). <http://www.ijcmas.com>
13. Denison, R.F. and Harter, B.L. (1995) Nitrate Effects on Nodule Oxygen Permeability and Leghemoglobin (Nodule Oximetry and Computer Modeling). *Plant Physiology*, 107, 1355-1364. <https://doi.org/10.1104/pp.107.4.1355>
14. Dong, R., Zhang, J., Huan, H., Bai, C., Chen, Z., & Liu, G. (2017). High salt tolerance of a Bradyrhizobium strain and its promotion of the growth of Stylosanthes guianensis. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(8). <https://doi.org/10.3390/ijms18081625>
15. Efrose R., Rosu C., Stedel K., Stefan A., Sirbu C., Gorgan L., Lambrou N., Flemetakis E., 2017. Molecular diversity and phylogeny of indigenous Rhizobium leguminosarum strains associated with Trifolium repens plants in Romania. *Antonie van Leeuwenhoek* (2018) 111:135-153.
16. Efrose, R.C., Rosu, C.M., Stedel, C. et al. Molecular diversity and phylogeny of indigenous Rhizobium leguminosarum strains associated with Trifolium repens plants in Romania. *Antonie van Leeuwenhoek* 111, 135–153 (2018). <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0934-3>
17. Enhanced Bacterial Growth and Gene Expression of D-Amino Acid Dehydrogenase With D-Glutamate as the Sole Carbon Source, Naganuma Takeshi , Inuma Yoshiakira , Nishiwaki Hitomi , Murase Ryota , Masaki Kazuo , Nakai Ryosuke 2018 *Frontiers in Microbiology*
18. Farissi, Mohamed & Bouizgaren, Abdelaziz & Faissal, AZIZ & Faghire, Mustapha & Ghoulam, Cherki. (2014). Isolation and screening of rhizobial strains nodulating alfalfa for their tolerance to some environmental stresses. *PACESETTER JOURNAL OF AGRICULTURAL SCIENCE RESEARCH*. 2. 9-19.
19. Fiodor A, Singh S, Pranaw K. The Contrivance of Plant Growth Promoting Microbes to Mitigate Climate Change Impact in Agriculture. *Microorganisms*. 2021; 9(9):1841. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091841>
20. Flores-Félix, J.D., Menéndez, E., Rivera, L.P., Marcos-García, M., Martínez-Hidalgo, P., Mateos, P.F., Martínez-Molina, E., Velázquez, M.d.l.E., García-Fraile, P. and Rivas, R. (2013), Use of Rhizobium leguminosarum as a potential biofertilizer for Lactuca sativa and Daucus carota crops. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.*, 176: 876-882. <https://doi.org/10.1002/jpln.201300116>
21. Flowers, T. J., Galal, H. K., & Bromham, L. (2010). "Evolution of halophytes: multiple origins of salt tolerance in land plants." *Functional Plant Biology*, 37(7), 604-612.
22. Gaurav A, Bakht P, Saini M, Pandey S, Pathania R. Role of bacterial efflux pumps in antibiotic resistance, virulence, and strategies to discover novel efflux pump inhibitors. *Microbiology (Reading)*. 2023 May;169(5):001333. doi: 10.1099/mic.0.001333. PMID: 37224055; PMCID: PMC10268834.

23. Geilfus, C. M., Niehaus, K., Gódde, V., Hasler, M., Zörb, C., Gorzolka, K., Jezek, M., Senbayram, M., Ludwig-Müller, J., & Mühling, K. H. (2015). Fast responses of metabolites in *Vicia faba* L. to moderate NaCl stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 92, 19–29. <https://doi.org/10.1016/J.PLAPHY.2015.04.008>
24. Goodsell, D. S. 2002 Glutamine Synthetase. RCSB Protein Data Bank
25. Gunde-Cimerman, N., Plemenitaš, A., & Oren, A. (2018). Strategies of adaptation of microorganisms of the three domains of life to high salt concentrations. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 42, Issue 3, pp. 353–375). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy009>
26. Hammami S., Roux C., Fitouri S., Lajudie P., Duponnois R., Jeddi F., 2019. Genetic diversity of rhizobia associated with root nodules of white lupin (*Lupinus albus* L.) in Tunisian calcareous soils. *Systematic and Applied Microbiology* 42 (2019) 448- 456.
27. Hao X., Lin Y., Johnstone L., Baltrus D., Miller S., Wei G., Rensing C., 2018. Draft Genome Sequence of Plant Growth-Promoting Rhizobium Mesorhizobium amorphae, Isolated from Zinc-Lead Mine Tailings. *Journal of Bacteriology* (2018) p. 736-737.
28. Holland IB, Blight MA. ABC-ATPases, adaptable energy generators fuelling transmembrane movement of a variety of molecules in organisms from bacteria to humans. *J Mol Biol.* 1999 Oct 22;293(2):381-99. doi: 10.1006/jmbi.1999.2993. PMID: 10529352.
29. Huntley, J.C., 1990. Robinia pseudoacacia L. black locust. In: Burns, R.M., Honkala, B.H., (Eds.), *Silvic of North America 2. Hardwoods. Agric. Hand.* 654, Washington, pp. 755–761.
30. Kumar, Nitin, et al. "Bacterial genospecies that are not ecologically coherent: population genomics of *Rhizobium leguminosarum*." *Open biology* 5.1 (2015): 140133.
31. Kuzma, Monika M., Stephen Hunt, and David B. Layzell. "Role of oxygen in the limitation and inhibition of nitrogenase activity and respiration rate in individual soybean nodules." *Plant physiology* 101.1 (1993): 161-169.
32. Laranjo, M., & Oliveira, S. (2011). Tolerance of Mesorhizobium type strains to different environmental stresses. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 99(3), 651–662. <https://doi.org/10.1007/s10482-010-9539-9>
33. Legesse, S. (2016). *Isolation, Identification and Authentication of Root Nodule Bacteria (Rhizobia) in Promoting Sustainable Agricultural Productivity: A Review.* 6(1). www.iiste.org
34. M. A. Baset Miaand Z. H. Shamsuddin, Rhizobium as a crop enhancer and biofertilizer for increased cereal production *African Journal of Biotechnology* Vol. 9(37), pp. 6001-6009, 13 September, 2010
35. Martin G.D. 2019. Addressing geographical bias: A review of Robinia pseudoacacia (black locust) in the Southern Hemisphere. *South African Journal of Botany* 125 (2019) 481-492
36. Martin, G. D. "Addressing geographical bias: A review of Robinia pseudoacacia (black locust) in the Southern Hemisphere." *South African Journal of Botany* 125 (2019): 481-492
37. Mierzwa B., Wdowiak-Wrobel S., Malek W., 2009. Phenotypic, genomic and phylogenetic characteristics of rhizobia isolated from root nodules of Robinia pseudoacacia (black locust) growing in Poland and Japan. *Arch Microbiol* (2009) 191:697-710.
38. Miller-Williams, Mark, Peter C. Loewen, and Ivan J. Oresnik. "Isolation of salt-sensitive mutants of Sinorhizobium meliloti strain Rm1021." *Microbiology* 152.7 (2006): 2049-2059.
39. Mirete, S., Mora-Ruiz, M. R., Lamprecht-Grandío, M., de Figueras, C. G., Rosselló-Móra, R., & González-Pastor, J. E. (2015). Salt resistance genes revealed by functional metagenomics from

- brines and moderate-salinity rhizosphere within a hypersaline environment. *Frontiers in Microbiology*, 6(OCT). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01121>
40. Munevar, F. and Wollum, A.G., II (1982), Response of Soybean Plants to High Root Temperature as Affected by Plant Cultivar and Rhizobium Strain1. *Agron. J.*, 74: 138-142. <https://doi.org/10.2134/agronj1982.00021962007400010036>
 41. Munns, R. (2005). "Genes and salt tolerance: bringing them together." *New Phytologist*, 167(3), 645-663. T
 42. Munns, R., & Tester, M. (2008). "Mechanisms of salinity tolerance." *Annual Review of Plant Biology*, 59, 651-681.
 43. Nguyen, T. M., Pham, V. H. T., & Kim, J. (2015). *Mesorhizobium soli* sp. nov., a novel species isolated from the rhizosphere of *Robinia pseudoacacia* L. in South Korea by using a modified culture method. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 108(2), 301–310. <https://doi.org/10.1007/s10482-015-0481-8>
 44. Ormeño-Orrillo, Ernesto, and Esperanza Martínez-Romero. "A genomotaxonomy view of the *Bradyrhizobium* genus." *Frontiers in microbiology* 10 (2019): 1334.
 45. Palaniappan, P., Chauhan, P.S., Saravanan, V.S. et al. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacterial isolates from root nodule of *Lespedeza* sp.. *Biol Fertil Soils* 46, 807–816 (2010). <https://doi.org/10.1007/s00374-010-0485-5>
 46. Paquet JY, Diaz MA, Genevrois S, Grayon M, Verger JM, de Bolle X, Lakey JH, Letesson JJ, Cloeckeaert A. Molecular, antigenic, and functional analyses of Omp2b porin size variants of *Brucella* spp. *J Bacteriol.* 2001 Aug;183(16):4839-47. doi: 10.1128/JB.183.16.4839-4847.2001. PMID: 11466287; PMCID: PMC99538.
 47. Peter Vandamme, Johan Goris, Wen-Ming Chen, Paul de Vos, Anne Willems, *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., Nodulate the Roots of Tropical Legumes, *Systematic and Applied Microbiology*, Volume 25, Issue 4, 2002, Pages 507-512, ISSN 0723-2020,.
 48. Rasolomampianina, R., et al. "Nitrogen-fixing nodules from rose wood legume trees (*Dalbergia* spp.) endemic to Madagascar host seven different genera belonging to α - and β -Proteobacteria." *Molecular Ecology* 14.13 (2005): 4135-4146.
 49. Shanmugam, K. T., F. O’Gara, K. Andersen, and R. C. Valentine. 1978. Biological Nitrogen Fixation. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 29: 263–276. doi:10.1146/annurev.pp.29.060178.001403
 50. Shrivastava P, Kumar R. Soil salinity: A serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation. *Saudi J Biol Sci.* 2015;22(2):123-131. doi:10.1016/j.sjbs.2014.12.001
 51. Sitzia, T., et al. "*Robinia pseudoacacia* in Europe: distribution, habitat, usage and threats." *European atlas of forest tree species*. Publication office of the European Union, Luxembourg (2016): 166-167.
 52. Somasegaran, P., & Hoben, H. J. (1985). *METHODS IN LEGUME-RHIZOBIUM TECHNOLOGY* * *NifTAL* and *MIRCEN* are acronyms for *Nitrogen fixation in Tropical Agricultural Legumes and Microbiological Resources Center*, respectively.
 53. St.Clair SB and Lynch JP (2010). The opening of Pandora’s Box: climate change impacts on soil fertility and crop nutrition in developing countries. *Plant and Soil* 335: 101-115.
 54. Subba Rao N.S., 1997, *Soil Microorganisms and Plant Growth*, Oxford and IBH Publishing Co. Allen E.K. and Allen O.N., 1950, *Bact. Revs*, 14:273 .

55. T. Sitzia, A. Cierjacks, D. de Rigo, G. Caudullo Robinia pseudoacacia in Europe: distribution, habitat, usage and threats J. San-Miguel-Ayanz, D. de Rigo, G. Caudullo, T. Houston Durrant, A. Mauri (Eds.), European Atlas of Forest Tree Species, Publication office of the European Union, Luxembourg (2016), pp. 166-167
56. Teng, Y., Wang, X., Li, L., Li, Z., & Luo, Y. (2015). Rhizobia and their bio-partners as novel drivers for functional remediation in contaminated soils. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 6, Issue FEB). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00032>
57. Tester, M., & Davenport, R. (2003). "Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants." *Annals of Botany*, 91(5), 503-527.
58. Trujillo, M., Alonso-Vega, P., Rodríguez, R. et al. The genus *Micromonospora* is widespread in legume root nodules: the example of *Lupinus angustifolius*. *ISME J* 4, 1265–1281 (2010). <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.55>
59. Ulrich, A., & Zaspel, I. (2018). *Phylogenetic diversity of rhizobial strains nodulating Robinia pseudoacacia L* (Vol. 146). www.microbiologyresearch.org
60. Vandamme, Peter, et al. "*Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes." *Systematic and applied microbiology* 25.4 (2002): 507-512.
61. Ventorino, V., Caputo, R., de Pascale, S., Fagnano, M., Pepe, O., & Moschetti, G. (2012). Response to salinity stress of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* strains in the presence of different legume host plants. *Annals of Microbiology*, 62(2), 811–823. <https://doi.org/10.1007/s13213-011-0322-6>
62. Veronica M. Reis , Fabio B. Dos Reis Jr, Joana F. Salles, Michael Schloter Characterisation of Different Polyclonal Antisera to Quantify *Herbaspirillum* spp. in Elephant Grass (*Pennisetum purpureum* Schun.) *Symbiosis* 29 (2000) 139-150.
63. Vidal, Céline & Chantreuil, Clémence & Berge, Odile & Mauré, Lucette & Escarré, José & Béna, Gilles & Brunel, Brigitte & Cleyet-Marel, Jean-Claude. (2009). *Mesorhizobium metallidurans* sp. nov., a metal-resistant symbiont of *Anthyllis vulneraria* growing on metalicolous soil in Languedoc, France. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 59. 850-5. [10.1099/ijs.0.003327-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.003327-0).
64. Walker, John E. (2013). *The ATP synthase: the understood, the uncertain and the unknown*. *Biochemical Society Transactions*, 41(1), 1–16. doi:10.1042/BST20110773
65. Wei, G., Chen, W., Zhu, W., Chen, C., Young, J. P. W., & Bontemps, C. (2009). Invasive *Robinia pseudoacacia* in China is nodulated by *Mesorhizobium* and *Sinorhizobium* species that share similar nodulation genes with native American symbionts. *FEMS Microbiology Ecology*, 68(3), 320–328. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00673.x>
66. Weir, B. S. "The current taxonomy of rhizobia. New Zealand rhizobia website." <http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia.html> (2011).
67. Wekesa C, Asudi GO, Okoth P, Reichelt M, Muoma JO, Furch ACU, Oelmüller R. Rhizobia Contribute to Salinity Tolerance in Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Cells*. 2022 Nov 16;11(22):3628. doi: 10.3390/cells11223628. PMID: 36429056; PMCID: PMC9688157.
68. Xu, Kai Wei, et al. "Symbiotic effectiveness and phylogeny of rhizobia isolated from faba bean (*Vicia faba* L.) in Sichuan hilly areas, China." *Systematic and applied microbiology* 38.7 (2015): 515-523.
69. Yang, Jungwook et al. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress, *Trends in Plant Science*, Volume 14, Issue 1, 1 – 4 <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.10.004> (2008)

Βιβλιογραφία εικόνων

1. Danyal, Karamatullah & Shaw, et al. (2016). Negative cooperativity in the nitrogenase Fe protein electron delivery cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 113. E5783-E5791. 10.1073/pnas.1613089113.
2. Signorelli S, Sainz M, Tabares-da Rosa S and Monza J (2020) The Role of Nitric Oxide in Nitrogen Fixation by Legumes. *Front. Plant Sci.* 11:521. doi: 10.3389/fpls.2020.00521
3. Ninjatacoshell, Public domain, via Wikimedia Commons
4. Laranjo, Marta & Alexandre, Ana & Oliveira, Solange. (2013). Legume growth-promoting rhizobia: An overview on the Mesorhizobium genus. *Microbiological research*. 169. 10.1016/j.micres.2013.09.012.
5. Patric, <https://www.bv-brc.org/>
6. Orthovenn 3
7. Illumina <https://www.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/beginners.html>

Βιβλιογραφία patric

1. Wattam AR, Davis JJ, Assaf R, Boisvert S, Brettin T, Bun C, Conrad N, Dietrich EM, Disz T, Gabbard JL, et al. 2017. Improvements to PATRIC, the all-bacterial Bioinformatics Database and Analysis Resource Center. *Nucleic Acids Res* 45:D535-D542.
2. Brettin T, Davis JJ, Disz T, Edwards RA, Gerdes S, Olsen GJ, Olson R, Overbeek R, Parrello B, Pusch GD, et al. 2015. RASTtk: a modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes. *Sci Rep* 5:8365.
3. Schomburg I, Chang A, Ebeling C, Gremse M, Heldt C, Huhn G, Schomburg D. 2004. BRENDA, the enzyme database: updates and major new developments. *Nucleic Acids Res* 32:D431-D433.
4. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT. 2000. Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nature genetics* 25:25.
5. Kanehisa M, Sato Y, Kawashima M, Furumichi M, Tanabe M. 2016. KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic Acids Res* 44:D457-462.
6. Davis JJ, Gerdes S, Olsen GJ, Olson R, Pusch GD, Shukla M, Vonstein V, Wattam AR, Yoo H. 2016. PATtyFams: Protein Families for the Microbial Genomes in the PATRIC Database. *Front Microbiol* 7:118.
7. Overbeek R, Begley T, Butler RM, Choudhuri JV, Chuang H-Y, Cohoon M, de Crécy-Lagard V, Diaz N, Disz T, Edwards R. 2005. The subsystems approach to genome annotation and its use in the project to annotate 1000 genomes. *Nucleic Acids Res* 33:5691-5702.
8. Saier Jr MH, Reddy VS, Tsu BV, Ahmed MS, Li C, Moreno-Hagelsieb G. 2015. The transporter classification database (TCDB): recent advances. *Nucleic Acids Res* 44:D372-D379.
9. Mao C, Abraham D, Wattam AR, Wilson MJ, Shukla M, Yoo HS, Sobral BW. 2015. Curation, integration and visualization of bacterial virulence factors in PATRIC. *Bioinformatics* 31:252-258.
10. Chen L, Zheng D, Liu B, Yang J, Jin Q. 2016. VFDB 2016: hierarchical and refined dataset for big data analysis-10 years on. *Nucleic Acids Res* 44:D694-D697.
11. Zhu F, Han B, Kumar P, Liu X, Ma X, Wei X, Huang L, Guo Y, Han L, Zheng C. 2009. Update of TTD: therapeutic target database. *Nucleic Acids Res* 38:D787-D791.

12. Law V, Knox C, Djoumbou Y, Jewison T, Guo AC, Liu Y, Maciejewski A, Arndt D, Wilson M, Neveu V, et al. 2014. DrugBank 4.0: shedding new light on drug metabolism. *Nucleic Acids Res* 42:D1091-1097.
13. McArthur AG, Waglechner N, Nizam F, Yan A, Azad MA, Baylay AJ, Bhullar K, Canova MJ, De Pascale G, Ejim L. 2013. The comprehensive antibiotic resistance database. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 57:3348-3357.
14. Wattam AR, Davis JJ, Assaf R, Boisvert S, Brettin T, Bun C, Conrad N, Dietrich EM, Disz T, Gabbard JL, et al. 2017. Improvements to PATRIC, the all-bacterial Bioinformatics Database and Analysis Resource Center. *Nucleic Acids Res* 45:D535-D542.
15. Ondov BD, Treangen TJ, Melsted P, Mallonee AB, Bergman NH, Koren S, Phillippy AM. 2016. Mash: fast genome and metagenome distance estimation using MinHash. *Genome biology* 17:132.
16. Davis JJ, Gerdes S, Olsen GJ, Olson R, Pusch GD, Shukla M, Vonstein V, Wattam AR, Yoo H. 2016. PATtyFams: Protein Families for the Microbial Genomes in the PATRIC Database. *Front Microbiol* 7:118.
17. Edgar RC. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 32:1792-1797.
18. Stamatakis A. 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30:1312-1313.
19. Stamatakis A, Hoover P, Rougemont J. 2008. A rapid bootstrap algorithm for the RAxML web servers. *Systematic biology* 57:758-771.

Orthovenn 3

Sun J, Lu F, Luo Y, Bie L, Xu L, Wang Y. OrthoVenn3: an integrated platform for exploring and visualizing orthologous data across genomes. *Nucleic Acids Res.* 2023 Jul 5;51(W1):W397-W403. doi: 10.1093/nar/gkad313. PMID: 37114999; PMCID: PMC10320085.

6. Επίμετρο

Protein Cluster List and Respective GO annotations						
Cluster ID	Swiss-Prot Hit	Proteins in the cluster	YP222	YP364	YP412	GO Annotation
32	P54988	68287.395.peg.839	✓			GO:0003700; F:DNA-binding transcription factor activity; IEA:InterPro
32		68287.395.peg.3590	✓			
32		68287.395.peg.3603	✓			
32		68287.395.peg.3570	✓			
32		68287.405.peg.2426			✓	
34	P32051	68287.395.peg.6550	✓			GO:0005886; C:plasma membrane; IEA:UniProtKB-SubCell
34		68287.395.peg.4618	✓			
34		68287.395.peg.4940	✓			
34		68287.395.peg.926	✓			
34		68287.395.peg.6130	✓			
85	O05494	68287.395.peg.6181	✓			GO:0043565; F:sequence-specific DNA binding; IEA:InterPro
85		68287.395.peg.3750	✓			
85		68287.395.peg.505	✓			
85		68287.395.peg.5101	✓			
86	A5UMN6	68287.405.peg.2421			✓	GO:0046872; F:metal ion binding; IEA:UniProtKB-KW
86		68287.405.peg.2411			✓	
86		68287.405.peg.2414			✓	
856	P26489	68287.395.peg.7173	✓			GO:0006355; P:regulation of transcription, DNA-templated; IEA:InterPro
856		68287.395.peg.7162	✓			
856		68287.405.peg.2078			✓	
4110	Q58374	68287.405.peg.2433			✓	GO:0006749; P:glutathione metabolic process; IBA:GO_Central
4110		68287.395.peg.3602	✓			
4110		68287.395.peg.3628	✓			
5511	P13398	68287.395.peg.6089	✓			GO:0019876; P:nylon catabolic process; IEA:UniProtKB-KW
5511		68287.395.peg.7362	✓			
5511		68287.395.peg.7505	✓			
5513	P14755	68287.395.peg.828	✓			GO:0006631; P:fatty acid metabolic process; IEA:InterPro
5513		68287.395.peg.3651	✓			
5513		68287.395.peg.2092	✓			
5514	Q9I923	68287.395.peg.3756	✓			GO:0050848; P:regulation of calcium-mediated signaling; ISS:UniProtKB
5514		68287.395.peg.5993	✓			

5514		68287.395.peg.2090	✓			
5516	P55502	68287.395.peg.6658	✓			GO:0006313; P:transposition, DNA-mediated; IEA:InterPro
5516		68287.395.peg.6673	✓			
5516		68287.395.peg.6677	✓			
5517	Q18DN4	68287.395.peg.5296	✓			GO:0007156; P:homophilic cell adhesion via plasma membrane adhesion molecules; IEA:InterPro
5517		68287.395.peg.1391	✓			
5517		68287.395.peg.1392	✓			
5518	P21175	68287.395.peg.5485	✓			GO:1903805; P:L-valine import across plasma membrane; IMP:PseudoCAP
5518		68287.395.peg.3607	✓			
5518		68287.395.peg.3620	✓			
5519	P14322	68287.395.peg.6696	✓			GO:0006313; P:transposition, DNA-mediated; IEA:InterPro
5519		68287.395.peg.7561	✓			
5519		68287.395.peg.7563	✓			
5521	Q46855	68287.395.peg.1506	✓			GO:0006351; P:transcription, DNA-templated; ISS:EcoCyc
5521		68287.395.peg.3578	✓			
5521		68287.395.peg.3725	✓			
5525	O13842	68287.405.peg.2427			✓	GO:0034232; P:ascospore wall chitin catabolic process; IMP:PomBase
5525		68287.405.peg.2406			✓	
5526	Q2RSB2	68287.405.peg.8206			✓	GO:0006740; P:NADPH regeneration; IDA:UniProtKB
5526		68287.405.peg.8207			✓	
5527	Q98HQ4	68287.405.peg.8159			✓	GO:0035999; P:tetrahydrofolate interconversion; IEA:UniProtKB- UniPathway
5527		68287.405.peg.7523			✓	
5528	P40401	68287.405.peg.6936			✓	GO:0042918; P:alkanesulfonate transport; IBA:GO_Central
5528		68287.405.peg.6937			✓	
5530	P08262	68287.405.peg.4141			✓	GO:0006782; P:protoporphyrinogen IX biosynthetic process; IEA:UniProtKB- UniPathway
5530		68287.405.peg.1205			✓	
5531	P08262	68287.405.peg.8202			✓	GO:0006782; P:protoporphyrinogen IX biosynthetic process; IEA:UniProtKB- UniPathway
5531		68287.405.peg.8203			✓	
5532	Q2RSB4	68287.405.peg.4946			✓	GO:0050661; F:NADP binding; IEA:InterPro
5532		68287.405.peg.6958			✓	

5533	P06693	68287.405.peg.7426		✓	GO:0015074; P:DNA integration; IEA:UniProtKB-KW
5533		68287.405.peg.2384		✓	
5722	P44736	68287.405.peg.6778		✓	GO:0008643; P:carbohydrate transport; IEA:UniProtKB-KW
5722		68287.395.peg.860	✓		
5737	P55629	68287.405.peg.731		✓	GO:0006355; P:regulation of transcription, DNA-templated; IEA:InterPro
5737		68287.395.peg.6649	✓		
5867	Q5F882	68287.405.peg.4850		✓	GO:0044001; P:migration in host; IMP:UniProtKB
5867		68287.395.peg.7291	✓		
5921	P30149	68287.405.peg.6025		✓	GO:0010212; P:response to ionizing radiation; IMP:EcoCyc
5921		68287.395.peg.7091	✓		
6167	Q44665	68287.396.peg.539	✓		GO:0006811; P:ion transport; IEA:UniProtKB-KW
6167		68287.396.peg.5851	✓		
6168	P55386	68287.396.peg.4972	✓		GO:0007165; P:signal transduction; IEA:InterPro
6168		68287.396.peg.6736	✓		
6170	Q09920	68287.396.peg.2528	✓		GO:0033215; P:reductive iron assimilation; IMP:PomBase
6170		68287.396.peg.5969	✓		
6171	P15939	68287.396.peg.6123	✓		GO:0006355; P:regulation of transcription, DNA-templated; IEA:InterPro
6171		68287.396.peg.6110	✓		
6172	O42899	68287.396.peg.2536	✓		GO:0033617; P:mitochondrial respiratory chain complex IV assembly; ISS:PomBase
6172		68287.396.peg.2534	✓		
6174	Q552D9	68287.396.peg.6737	✓		GO:0006275; P:regulation of DNA replication; ISS:UniProtKB
6174		68287.396.peg.4971	✓		
6175	POAC29	68287.405.peg.2121		✓	GO:0035999; P:tetrahydrofolate interconversion; IEA:UniProtKB- UniPathway
6175		68287.405.peg.2404		✓	
6176	P76068	68287.405.peg.7434		✓	GO:0045881; P:positive regulation of sporulation resulting in formation of a cellular spore; IBA:GO_Central
6176		68287.405.peg.2400		✓	
6178	Q9HWH8	68287.405.peg.7434		✓	GO:0003700; F:DNA-binding transcription factor activity; IEA:InterPro
6178		68287.405.peg.2400		✓	
6179	Q45331	68287.405.peg.8190		✓	GO:0006811; P:ion transport; IEA:UniProtKB-KW

6179		68287.405.peg.8022		✓	
6180	Q98HQ4	68287.405.peg.2435		✓	GO:0035999; P:tetrahydrofolate interconversion; IEA:UniProtKB-UniPathway
6180		68287.405.peg.2138		✓	
6181	Q45325	68287.405.peg.8100		✓	GO:0006811; P:ion transport; IEA:UniProtKB-KW
6181		68287.405.peg.6799		✓	
7046	O34906	68287.405.peg.772		✓	GO:0008233; F:peptidase activity; IEA:UniProtKB-KW
7046		68287.395.peg.2350	✓		
7051	Q57083	68287.405.peg.2100		✓	GO:0006351; P:transcription, DNA-templated; IBA:GO_Central
7051		68287.395.peg.1475	✓		
7072	D4GYG5	68287.405.peg.6165		✓	GO:0045232; P:S-layer organization; IEA:UniProtKB-UniPathway
7072		68287.395.peg.1758	✓		
7112	O34817	68287.405.peg.6957		✓	GO:0045892; P:negative regulation of transcription, DNA-templated; IBA:GO_Central
7112		68287.395.peg.413	✓		
7123	P19997	68287.405.peg.2798		✓	GO:0046677; P:response to antibiotic; IEA:UniProtKB-KW
7123		68287.395.peg.2016	✓		
7138	Q8A2E4	68287.405.peg.6932		✓	GO:0008615; P:pyridoxine biosynthetic process; IEA:UniProtKB-UniRule
7138		68287.395.peg.496	✓		
7262	B6J2S1	68287.405.peg.6771		✓	GO:0019518; P:L-threonine catabolic process to glycine; IEA:UniProtKB-UniPathway
7262		68287.395.peg.519	✓		
7295	Q8CEE7	68287.395.peg.3581	✓		GO:0010842; P:retina layer formation; IMP:MGI
7295		68287.395.peg.3723	✓		
7312	Q7N3E3	68287.405.peg.6794		✓	GO:0055085; P:transmembrane transport; IEA:InterPro
7312		68287.395.peg.3270	✓		
7340	Q9Z3Q0	68287.405.peg.2097		✓	GO:0035556; P:intracellular signal transduction; IEA:InterPro
7340		68287.395.peg.1472	✓		
7388	Q54H55	68287.405.peg.2099		✓	GO:0016491; F:oxidoreductase activity; IEA:UniProtKB-KW
7388		68287.395.peg.1474	✓		
7399	Q9HU78	68287.405.peg.717		✓	GO:0045892; P:negative regulation of transcription, DNA-templated; IBA:GO_Central

7399		68287.395.peg.518	✓			
7479	A9MCK4	68287.405.peg.723			✓	GO:0055130; P:D-alanine catabolic process; IEA:UniProtKB-UniPathway
7479		68287.395.peg.7522	✓			
7508	P0A177	68287.395.peg.1656	✓			GO:0030288; C:outer membrane-bounded periplasmic space; IEA:InterPro
7508		68287.395.peg.1220	✓			
7509	O87386	68287.395.peg.597	✓			GO:0046653; P:tetrahydrofolate metabolic process; IEA:InterPro
7509		68287.395.peg.5933	✓			
7510	P38096	68287.395.peg.3623	✓			GO:0006807; P:nitrogen compound metabolic process; IMP:AspGD
7510		68287.395.peg.3611	✓			
7513	O05151	68287.395.peg.3747	✓			GO:0019439; P:aromatic compound catabolic process; IEA:UniProtKB-KW
7513		68287.395.peg.498	✓			
7515	P95283	68287.395.peg.2385	✓			GO:0009405; P:pathogenesis; IMP:MTBBASE
7515		68287.395.peg.1995	✓			
7520	P0A194	68287.395.peg.3616	✓			GO:0006865; P:amino acid transport; IEA:UniProtKB-KW
7520		68287.395.peg.3606	✓			
7521	P35164	68287.395.peg.6421	✓			GO:0006355; P:regulation of transcription, DNA-templated; IEA:InterPro
7521		68287.395.peg.964	✓			
7522	P54420	68287.395.peg.910	✓			GO:0070981; P:L-asparagine biosynthetic process; IEA:UniProtKB-UniPathway
7522		68287.395.peg.919	✓			
7523	Q8XVS8	68287.395.peg.6003	✓			GO:0034194; P:D-galactonate catabolic process; IEA:UniProtKB-UniRule
7523		68287.395.peg.261	✓			
7524	P0AGI3	68287.395.peg.1018	✓			GO:0008643; P:carbohydrate transport; IEA:UniProtKB-KW
7524		68287.395.peg.562	✓			
7525	P36948	68287.395.peg.3587	✓			GO:0008643; P:carbohydrate transport; IEA:UniProtKB-KW
7525		68287.395.peg.3588	✓			
7526	Q56897	68287.395.peg.7525	✓			GO:0006313; P:transposition, DNA-mediated; IEA:InterPro
7526		68287.395.peg.6837	✓			
7528	A0QYL8	68287.395.peg.3726	✓			GO:0055085; P:transmembrane transport; IEA:InterPro
7528		68287.395.peg.3579	✓			
7529	P0A0J8	68287.395.peg.871	✓			GO:0055085; P:transmembrane transport; IEA:InterPro
7529		68287.395.peg.2078	✓			

7530	A7ZV62	68287.395.peg.4399	✓			GO:0045892; P:negative regulation of transcription, DNA-templated; IEA:UniProtKB-UniRule
7530		68287.395.peg.342	✓			
7532	A0QYB3	68287.395.peg.5998	✓			GO:0071322; P:cellular response to carbohydrate stimulus; IDA:UniProtKB
7532		68287.395.peg.5997	✓			
7534	Q9HXE3	68287.395.peg.6321	✓			GO:0009405; P:pathogenesis; IEA:UniProtKB-KW
7534		68287.395.peg.605	✓			
7535	O58760	68287.395.peg.3640	✓			GO:0055085; P:transmembrane transport; IEA:InterPro
7535		68287.395.peg.5097	✓			
7536	Q56902	68287.395.peg.90	✓			GO:0015774; P:polysaccharide transport; IEA:UniProtKB-KW
7536		68287.395.peg.100	✓			
7538	P27833	68287.395.peg.901	✓			GO:0000271; P:polysaccharide biosynthetic process; IBA:GO_Central
7538		68287.395.peg.124	✓			
7539	P07821	68287.395.peg.734	✓			GO:0055072; P:iron ion homeostasis; IEA:UniProtKB-KW
7539		68287.395.peg.3249	✓			
7541	C8VK14	68287.395.peg.734	✓			GO:0046872; F:metal ion binding; IEA:UniProtKB-KW
7541		68287.395.peg.3249	✓			
7543	P42061	68287.395.peg.7359	✓			GO:0030435; P:sporulation resulting in formation of a cellular spore; IEA:UniProtKB-KW
7543		68287.395.peg.7357	✓			
7546	Q47162	68287.395.peg.2468	✓			GO:0015891; P:siderophore transport; IEA:InterPro
7546		68287.395.peg.1299	✓			
7547	Q98FW0	68287.395.peg.6165	✓			GO:0046872; F:metal ion binding; IEA:UniProtKB-KW
7547		68287.395.peg.4730	✓			
7548	A5VU86	68287.395.peg.1778	✓			GO:0015031; P:protein transport; IEA:UniProtKB-KW
7548		68287.395.peg.3751	✓			
7549	Q2K204	68287.395.peg.4727	✓			GO:0015407; F:monosaccharide-transporting ATPase activity; IEA:UniProtKB-EC
7549		68287.395.peg.563	✓			
7550	O31827	68287.395.peg.913	✓			GO:0017000; P:antibiotic biosynthetic process; IEA:UniProtKB-KW
7550		68287.395.peg.917	✓			

7551	Q9KQH7	68287.395.peg.5442	✓			GO:0030497; P:fatty acid elongation; ISS:UniProtKB
7551		68287.395.peg.3548	✓			
7552	P37339	68287.395.peg.3683	✓			GO:0052852; F:very-long-chain-(S)-2- hydroxy-acid oxidase activity; IEA:UniProtKB-EC
7552		68287.395.peg.3609	✓			
7553	P40875	68287.395.peg.5932	✓			GO:0046653; P:tetrahydrofolate metabolic process; IEA:InterPro
7553		68287.395.peg.595	✓			
7554	P0A2J8	68287.395.peg.3641	✓			GO:0055085; P:transmembrane transport; IEA:InterPro
7554		68287.395.peg.5098	✓			
7556	P55646	68287.395.peg.7575	✓			GO:0015074; P:DNA integration; IEA:InterPro
7556		68287.395.peg.7332	✓			
7558	P21627	68287.395.peg.3605	✓			GO:1903806; P:L-isoleucine import across plasma membrane; IMP:PseudoCAP
7558		68287.395.peg.3618	✓			
7559	P52691	68287.395.peg.3684	✓			GO:0003700; F:DNA-binding transcription factor activity; IEA:InterPro
7559		68287.395.peg.3610	✓			
7560	Q62HW8	68287.395.peg.6904	✓			GO:0006096; P:glycolytic process; IEA:UniProtKB-UniRule
7560		68287.395.peg.775	✓			
7561	P44736	68287.395.peg.2094	✓			GO:0008643; P:carbohydrate transport; IEA:UniProtKB-KW
7561		68287.395.peg.5994	✓			
7562	P0A192	68287.395.peg.3608	✓			GO:0015658; F:branched-chain amino acid transmembrane transporter activity; IEA:InterPro
7562		68287.395.peg.3617	✓			

Φαίνονται οι ομαδοποιήσεις των πρωτεϊνών (protein clusters) που προβλέφθηκαν από το εργαλείο Orthovenn3 βάσει των λειτουργιών που προέκυψαν από την in silico γονιδιακή πρόβλεψη καθώς και τα στελέχη που αυτές εμφανίζονται. Από δεξιά προς τα αριστερά Αιριθμός Ομαδοποίηση πρωτεϊνών; Κωδικός στην βάση δεδομένων SWISS-PROT; Ταυτότητα πρωτεϊνής όπως προκύπτει από την in silico πρόβλεψη; Τα τρία μελετούμενα στελέχη με σειρά (YP222; YP364; YP412); Η λειτουργία των αντίστοιχων πρωτεϊνών όπως προκύπτει από την ΒΔ Gene Ontology.

		Percent Identity																							
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22		
Divergence	1	█	89.2	88.7	88.4	100.0	89.0	88.7	89.0	88.5	88.7	95.3	88.9	89.2	90.2	95.8	89.2	88.7	94.4	99.8	89.2	94.7	89.0	1	YP543
	2	11.7	█	88.5	89.0	89.2	88.0	88.5	88.4	88.9	88.4	88.5	87.9	88.5	88.9	89.7	97.2	88.5	90.5	89.0	97.5	89.4	88.4	2	YP533
	3	12.3	12.5	█	98.3	88.7	93.2	100.0	93.0	98.5	93.2	89.2	93.2	93.7	89.5	88.4	100.0	90.4	88.5	88.9	88.5	93.0	3	YP412	
	4	12.7	11.9	1.7	█	88.4	92.5	98.3	92.4	98.3	92.5	88.7	92.5	92.5	93.2	89.2	88.0	98.3	90.4	88.2	89.0	88.5	92.4	4	YP364
	5	0.0	11.7	12.3	12.7	█	89.0	88.7	89.0	88.5	88.7	95.3	88.9	89.2	90.2	95.8	89.2	88.7	94.4	99.8	89.2	94.7	89.0	5	YP222
	6	11.9	13.1	7.2	7.9	11.9	█	93.2	97.0	93.0	97.0	89.5	96.8	97.2	93.4	89.5	88.7	93.2	90.4	88.9	88.2	89.5	97.0	6	YP131
	7	12.3	12.5	0.0	1.7	12.3	7.2	█	93.0	98.5	93.2	89.2	93.2	93.2	93.7	89.5	88.4	100.0	90.4	88.5	88.9	88.5	93.0	7	YP122
	8	11.9	12.7	7.3	8.1	11.9	3.1	7.3	█	92.9	97.3	89.0	95.0	99.8	93.2	89.4	89.4	93.0	90.4	88.9	88.5	89.7	100.0	8	Mesorhizobium_sp_strain_XAP4
	9	12.5	12.1	1.5	1.7	12.5	7.3	1.5	7.5	█	93.0	88.9	93.0	93.0	93.2	89.4	88.2	98.5	90.4	88.4	89.2	88.4	92.9	9	Mesorhizobium_sp_strain_SF1
	10	12.3	12.6	7.1	7.9	12.3	3.1	7.1	2.7	7.3	█	89.2	95.2	97.5	93.5	89.2	88.9	93.2	90.0	88.5	88.4	89.5	97.3	10	Mesorhizobium_sp_strain_LMG17149
	11	4.8	12.6	11.7	12.3	4.8	11.3	11.7	11.9	12.1	11.7	█	90.0	89.2	89.9	96.3	89.0	89.2	94.4	95.2	88.9	93.9	89.0	11	Mesorhizobium_sp_NZP2077
	12	12.2	13.3	7.2	7.9	12.2	3.2	7.2	5.2	7.4	5.0	10.8	█	95.2	93.7	89.5	88.4	93.2	90.2	88.7	88.4	89.7	95.0	12	Mesorhizobium_sp_M7D.F.Ca.US.005.01.1
	13	11.7	12.5	7.2	7.9	11.7	2.9	7.2	0.2	7.3	2.5	11.7	5.0	█	93.4	89.5	89.5	93.2	90.5	89.0	88.7	89.9	99.8	13	Mesorhizobium_sp_CCANP14
	14	10.6	12.1	6.6	7.2	10.6	7.0	6.6	7.2	7.2	6.8	10.9	6.7	7.0	█	89.9	88.9	93.7	90.9	90.0	88.5	90.2	93.2	14	Mesorhizobium_sp_B2-1-8
	15	4.3	11.1	11.3	11.7	4.3	11.3	11.3	11.5	11.5	11.7	3.8	11.4	11.3	11.0	█	89.7	89.5	94.9	95.7	90.0	95.7	89.4	15	Mesorhizobium_sp_AR02
	16	11.7	2.9	12.7	13.0	11.7	12.3	12.7	11.5	12.9	12.1	11.9	12.7	11.3	12.1	11.1	█	88.4	89.9	89.0	97.3	89.5	89.4	16	Mesorhizobium_sp_131-2-5
	17	12.3	12.5	0.0	1.7	12.3	7.2	0.0	7.3	1.5	7.1	11.7	7.2	7.2	6.6	11.3	12.7	█	90.4	88.5	88.9	88.5	93.0	17	Mesorhizobium_sangaii_strain_N121
	18	5.9	10.2	10.3	10.3	5.9	10.3	10.3	10.4	10.4	10.7	5.9	10.6	10.2	9.8	5.4	10.9	10.3	█	94.2	90.5	93.7	90.4	18	Mesorhizobium_opportunism_WSM2075
	19	0.2	11.9	12.5	12.9	0.2	12.1	12.5	12.1	12.7	12.5	5.0	12.4	11.9	10.8	4.5	11.9	12.5	6.1	█	89.0	94.5	88.9	19	Mesorhizobium_loti_strain
	20	11.7	2.5	12.1	11.9	11.7	12.9	12.1	12.5	11.7	12.6	12.1	12.7	12.3	12.5	10.7	2.7	12.1	10.2	11.9	█	90.0	88.5	20	Mesorhizobium_loti_MAFF303099
	21	5.5	11.5	12.5	12.5	5.5	11.3	12.5	11.1	12.7	11.3	6.5	11.1	10.9	10.5	4.5	11.3	12.5	6.6	5.7	10.7	█	89.7	21	Mesorhizobium_huakuii
	22	11.9	12.7	7.3	8.1	11.9	3.1	7.3	0.0	7.5	2.7	11.9	5.2	0.2	7.2	11.5	11.5	7.3	10.4	12.1	12.5	11.1	█	22	Mesorhizobium_ciceri_strain_R30
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22			

Ποσοστά ομοιοτήτων για το τμήμα του γονιδίου *glnII* των μελετώμενων στελεχών

		Percent Identity																				
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19		
Divergence	1	█	100.0	94.9	94.9	98.3	97.0	94.9	96.8	96.8	96.8	97.9	96.4	95.1	98.5	97.0	97.4	97.4	96.8	96.6	1	YP543
	2	0.0	█	94.9	94.9	98.3	97.0	94.9	96.8	96.8	96.8	97.9	96.4	95.1	98.5	97.0	97.4	97.4	96.8	96.6	2	YP533
	3	5.3	5.3	█	100.0	94.9	95.5	100.0	96.4	96.6	96.6	95.3	95.9	99.8	95.5	94.9	94.7	95.7	96.6	96.2	3	YP412
	4	5.3	5.3	0.0	█	94.9	95.5	100.0	96.4	96.6	96.6	95.3	95.9	99.8	95.5	94.9	94.7	95.7	96.6	96.2	4	YP364
	5	1.7	1.7	5.3	5.3	█	96.4	94.9	96.6	96.6	96.6	97.9	96.2	95.1	97.9	97.0	97.4	97.4	96.6	96.4	5	YP222
	6	3.1	3.1	4.6	4.6	3.7	█	95.5	98.1	97.9	97.9	96.6	97.4	95.7	97.2	95.9	95.9	96.8	97.9	97.7	6	YP131
	7	5.3	5.3	0.0	0.0	5.3	4.6	█	96.4	96.6	96.6	95.3	95.9	99.8	95.5	94.9	94.7	95.7	96.6	96.2	7	YP122
	8	3.3	3.3	3.7	3.7	3.5	1.9	3.7	█	99.1	99.1	96.8	97.4	96.6	97.0	96.2	96.2	97.0	99.1	99.6	8	Mesorhizobium_sp_strain_XAP4
	9	3.3	3.3	3.5	3.5	3.5	2.2	3.5	0.9	█	100.0	96.8	97.4	96.8	97.0	96.2	96.2	97.0	100.0	99.1	9	Mesorhizobium_sp_strain_DSM_30133
	10	3.3	3.3	3.5	3.5	3.5	2.2	3.5	0.9	0.0	█	96.8	97.4	96.8	97.0	96.2	96.2	97.0	100.0	99.1	10	Mesorhizobium_sp_strain_DSM_1978
	11	2.2	2.2	4.9	4.9	2.2	3.5	4.9	3.3	3.3	█	96.6	95.5	97.9	98.7	99.1	98.7	96.8	96.6	11	Mesorhizobium_sp_SCAU13	
	12	3.7	3.7	4.2	4.2	3.9	2.6	4.2	2.6	2.6	2.6	█	96.2	96.6	95.5	95.9	96.8	97.4	97.0	12	Mesorhizobium_sp_M7D.F.Ca.US.005.01.1	
	13	5.1	5.1	0.2	0.2	5.1	4.4	0.2	3.5	3.3	3.3	4.6	4.0	█	95.7	94.7	94.9	95.7	96.8	96.4	13	Mesorhizobium_sp
	14	1.5	1.5	4.6	4.6	2.2	2.8	4.6	3.0	3.0	3.0	2.2	3.5	4.4	█	97.0	97.4	97.4	97.0	96.8	14	Mesorhizobium_sp_113-1-2
	15	3.1	3.1	5.3	5.3	3.1	4.2	5.3	3.9	3.9	3.9	1.3	4.6	5.6	3.1	█	98.7	97.7	96.2	95.9	15	Mesorhizobium_loti_MAFF303099
	16	2.6	2.6	5.6	5.6	2.6	4.2	5.6	3.9	3.9	3.9	0.9	4.2	5.3	2.6	1.3	█	98.3	96.2	95.9	16	Mesorhizobium_japonicum_strain_R7Astar
	17	2.6	2.6	4.4	4.4	2.6	3.3	4.4	3.0	3.0	3.0	1.3	3.3	4.4	2.6	2.4	1.7	█	97.0	96.8	17	Mesorhizobium_huakuii_7653R
	18	3.3	3.3	3.5	3.5	3.5	2.2	3.5	0.9	0.0	0.0	3.3	2.6	3.3	3.0	3.9	3.9	3.0	█	99.1	18	Mesorhizobium_ciceri_strain_CC1192
	19	3.5	3.5	3.9	3.9	3.7	2.4	3.9	0.4	0.9	0.9	3.5	3.1	3.7	3.3	4.2	4.2	3.3	0.9	█	19	Mesorhizobium_ciceri_biovar_biserrulae
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19			

Ποσοστά ομοιοτήτων για το τμήμα του γονιδίου *atpD* των μελετώμενων στελεχών

		Percent Identity																									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	
Divergence	1	100.0	95.6	95.8	99.8	96.3	95.8	96.3	98.1	95.3	96.7	95.6	96.0	94.6	95.1	95.8	97.4	95.1	95.1	95.3	95.3	97.4	97.4	96.3	96.3	1	YP543
	2	0.0	95.6	95.8	99.8	96.3	95.8	96.3	98.1	95.3	96.7	95.6	96.0	94.6	95.1	95.8	97.4	95.1	95.1	95.3	95.3	97.4	97.4	96.3	96.3	2	YP533
	3	4.4	4.4	98.8	95.8	96.7	99.8	96.7	95.6	95.3	94.8	95.6	94.6	95.3	97.7	96.5	95.3	94.8	94.6	94.6	96.0	94.8	94.8	96.7	97.0	3	YP412
	4	4.1	4.1	1.2	96.0	97.0	98.6	96.3	95.3	96.0	95.1	95.8	94.4	96.3	97.4	96.3	95.1	94.6	95.3	94.4	95.6	94.6	94.6	96.3	96.5	4	YP364
	5	0.0	0.0	4.3	4.1	96.0	96.0	97.9	95.1	96.5	95.3	95.8	94.4	94.8	95.6	97.2	94.8	94.8	95.1	95.1	97.2	97.2	96.0	96.0	5	YP222	
	6	3.9	3.9	3.1	2.9	96.0	97.0	97.0	95.8	96.5	95.1	97.0	95.1	95.1	96.3	96.5	95.6	94.6	95.8	95.3	96.5	95.3	95.3	97.0	97.0	6	YP131
	7	4.4	4.4	0.0	1.2	4.4	3.1	97.0	95.8	95.6	95.1	95.8	94.8	95.6	97.9	96.7	95.6	95.1	94.8	94.8	96.3	95.1	95.1	97.0	97.2	7	YP122
	8	3.9	3.9	3.1	3.6	3.9	3.1	96.3	95.8	95.3	95.8	95.8	95.1	96.0	96.5	96.0	95.1	94.8	95.1	96.3	95.6	95.6	100.0	99.1	8	Mesorhizobium_sp_WSM1497	
	9	1.9	1.9	4.4	4.6	1.9	4.4	4.4	3.9	95.3	97.7	95.6	97.4	94.1	95.1	95.6	98.4	97.0	94.6	97.2	95.1	97.9	97.9	96.3	96.3	9	Mesorhizobium_sp_strain_BD68
	10	4.9	4.9	4.6	3.9	4.9	3.6	4.6	4.4	4.9	94.6	95.8	94.6	93.9	94.8	94.8	95.1	94.6	94.8	94.4	94.8	94.6	94.6	95.8	95.8	10	Mesorhizobium_sp_strain_19LCo65A.1.1
	11	3.4	3.4	5.1	4.9	3.4	5.1	5.1	4.9	2.4	5.7	95.6	96.7	94.1	93.9	94.8	97.0	95.8	93.9	96.0	94.1	96.5	96.5	95.3	95.6	11	Mesorhizobium_sp_NZP2234
	12	4.6	4.6	4.4	4.1	4.6	3.1	4.4	4.4	4.6	4.4	4.6	94.8	93.9	94.8	95.8	95.3	94.1	95.6	94.1	96.3	94.8	94.8	95.8	96.3	12	Mesorhizobium_sp_M7D.F.Ca.US.005.01.1
	13	4.1	4.1	5.4	5.6	4.1	5.1	5.4	4.4	2.6	5.7	3.4	5.4	93.7	94.1	94.6	97.7	96.0	93.7	97.4	94.4	97.2	97.2	95.8	95.8	13	Mesorhizobium_sp_L-2-11
	14	5.6	5.6	4.6	3.6	5.6	5.1	4.6	5.1	6.2	6.4	6.2	6.4	6.7	95.3	95.1	94.4	93.4	93.7	94.6	93.2	93.9	93.9	95.1	94.8	14	Mesorhizobium_sp_JNR15
	15	5.1	5.1	2.1	2.4	5.1	3.9	2.1	4.1	5.1	5.4	6.4	5.4	6.2	4.9	96.0	94.8	94.4	94.1	95.1	95.1	94.4	94.4	96.0	96.0	15	Mesorhizobium_sp_ICMP_14330
	16	4.4	4.4	3.4	3.6	4.4	3.6	3.4	3.6	4.6	5.4	5.4	4.4	5.7	5.2	4.1	95.3	95.1	93.9	94.4	96.3	95.1	95.1	96.5	96.0	16	Mesorhizobium_sp_AR07
	17	2.6	2.6	4.6	4.9	2.6	4.6	4.6	4.1	1.7	5.1	3.1	4.9	2.4	5.9	5.4	4.9	96.3	94.4	97.0	94.8	99.5	99.5	96.0	96.0	17	Mesorhizobium_sp_131-3-5
	18	5.1	5.1	5.1	5.4	5.1	5.6	5.1	5.1	3.1	5.6	4.4	6.2	4.1	7.0	5.9	5.1	3.9	93.7	96.0	94.8	95.8	95.8	95.1	95.1	18	Mesorhizobium_sanjuanii_BSA136
	19	5.1	5.1	5.4	4.6	5.1	4.4	5.4	5.4	5.7	5.4	6.4	4.6	6.7	6.7	6.2	6.4	5.9	6.7	93.9	95.3	93.9	93.9	94.8	94.8	19	Mesorhizobium_opportunistum
	20	4.9	4.9	5.4	5.6	4.9	4.9	5.4	5.1	2.9	5.9	4.1	6.2	2.6	5.7	5.1	5.9	3.1	4.1	6.5	94.1	96.5	96.5	95.1	95.1	20	Mesorhizobium_mediterraneum
	21	4.9	4.9	3.9	4.4	4.9	3.6	3.9	3.9	5.1	5.4	6.2	3.9	5.9	7.2	5.1	3.9	5.4	4.9	6.2	94.6	94.6	96.3	96.7	21	Mesorhizobium_loti_582	
	22	2.6	2.6	5.1	5.4	2.6	4.9	5.1	4.6	2.1	5.7	3.6	5.4	2.9	6.4	5.9	5.1	0.5	4.4	6.4	3.6	5.6	100.0	95.6	95.6	22	Mesorhizobium_jarvisii_ATCC_33669
	23	2.6	2.6	5.1	5.4	2.6	4.9	5.1	4.6	2.1	5.7	3.6	5.4	2.9	6.4	5.9	5.1	0.5	4.4	6.4	3.6	5.6	0.0	95.6	95.6	23	Mesorhizobium_huakuii_7653R
	24	3.9	3.9	3.1	3.6	3.9	3.1	3.1	0.0	3.9	4.4	4.9	4.4	4.4	5.1	4.1	3.6	4.1	5.1	5.4	5.1	3.9	4.6	4.6	99.1	24	Mesorhizobium_ciceri_R30
	25	3.9	3.9	2.9	3.4	3.9	3.1	2.9	0.9	3.9	4.4	4.6	3.9	4.4	5.4	4.1	4.1	4.1	5.1	5.4	5.1	3.4	4.6	4.6	0.9	25	Mesorhizobium_ciceri_biovvar_bisemulae
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25		

Ποσοστά ομοιοτήτων για το τμήμα του γονιδίου recA των μελετώμενων στελεχών

		Percent Identity																													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	
Divergence	1	92.7	89.8	97.6	92.3	97.6	97.6	97.6	97.6	97.6	97.2	89.4	92.3	89.4	97.6	97.6	97.6	97.6	97.2	97.6	92.3	97.6	96.7	97.6	97.6	97.6	97.6	96.7	96.3	1	Mesorhizobium_sp_R46074
	2	5.6	92.3	93.1	97.6	94.3	94.3	94.3	94.3	93.1	93.9	91.9	99.6	92.7	93.1	94.3	94.3	93.9	94.3	93.9	94.3	99.6	94.3	93.1	93.1	93.1	94.3	93.1	92.3	2	Mesorhizobium_septentrionale_strain
	3	8.8	8.2	89.8	91.9	91.1	91.1	91.1	91.1	91.1	89.8	90.7	89.8	91.9	91.1	89.8	91.1	91.1	91.1	90.7	91.1	91.9	91.1	89.8	89.8	89.8	91.1	89.8	88.6	3	Mesorhizobium_opportunistum
	4	0.4	7.3	11.0	92.7	98.4	98.0	98.0	98.0	100.0	98.0	89.8	92.7	89.4	100.0	98.4	98.4	98.4	98.0	98.4	92.7	98.0	96.7	100.0	100.0	98.0	96.7	98.8	4	Mesorhizobium_loti	
	5	6.1	2.5	8.6	7.7	93.9	93.9	93.9	93.9	92.7	93.5	90.2	97.2	91.5	92.7	93.9	93.9	93.5	93.9	97.2	93.9	92.7	92.7	92.7	93.9	92.7	91.5	5	Mesorhizobium_huakuii		
	6	0.4	5.9	9.6	1.7	6.4	99.6	99.6	99.6	99.6	98.4	99.6	91.1	93.9	90.7	98.4	100.0	100.0	99.6	100.0	93.9	99.6	98.4	98.4	98.4	98.4	97.2	6	Mesorhizobium_amorphae		
	7	0.4	5.9	9.5	2.1	6.4	100.0	100.0	100.0	98.0	99.2	91.1	93.9	90.7	98.0	99.6	99.6	99.6	99.2	99.6	93.9	100.0	98.4	98.0	98.0	100.0	98.4	96.7	7	Mesorhizobium_qingshengii	
	8	0.4	5.9	9.5	2.1	6.4	0.0	100.0	100.0	98.0	99.2	91.1	93.9	90.7	98.0	99.6	99.6	99.6	99.2	99.6	93.9	100.0	98.4	98.0	98.0	100.0	98.4	96.7	8	Mesorhizobium_metallicurans	
	9	0.4	5.9	9.5	2.1	6.4	0.0	0.0	100.0	98.0	99.2	91.1	93.9	90.7	98.0	99.6	99.6	99.6	99.2	99.6	93.9	100.0	98.4	98.0	98.0	100.0	98.4	96.7	9	Mesorhizobium_ciceri	
	10	0.4	5.9	9.5	2.1	6.4	0.0	0.0	98.0	99.2	91.1	93.9	90.7	98.0	99.6	99.6	99.6	99.2	99.6	93.9	100.0	98.4	98.0	98.0	100.0	98.4	96.7	10	Mesorhizobium_amorphae		
	11	0.4	7.3	11.0	0.0	7.7	1.7	2.1	2.1	2.1	2.1	98.0	89.8	92.7	89.4	100.0	98.4	98.4	98.4	98.0	98.4	92.7	98.0	96.7	100.0	100.0	98.0	96.7	98.8	11	Rhizobium_sp.
	12	0.8	6.4	10.0	2.1	6.8	0.4	0.8	0.8	0.8	2.1	90.7	93.5	90.2	98.0	99.6	99.6	99.6	99.2	99.6	93.5	99.2	98.0	98.0	98.0	99.2	98.0	96.7	98.8	12	Rhizobium_leguminosarum
	13	9.3	8.7	11.0	11.0	10.5	9.6	9.6	9.6	9.6	11.0	10.0	91.5	90.2	89.8	91.1	91.1	91.1	90.7	91.1	91.5	91.1	89.8	89.8	89.8	91.1	89.8	88.6	13	Microvirga_totononidis	
	14	6.1	0.4	8.6	7.8	2.9	6.4	6.4	6.4	6.4	7.8	6.8	9.1	92.3	92.7	93.9	93.9	93.5	93.9	100.0	93.9	92.7	92.7	92.7	93.9	92.7	91.9	14	Mesorhizobium_temperatum		
	15	9.3	7.7	9.6	11.5	9.1	10.0	10.0	10.0	10.0	11.5	10.5	10.5	8.2	89.4	90.7	90.7	90.7	90.2	90.7	92.3	90.7	89.4	89.4	89.4	90.7	89.4	88.2	15	Mesorhizobium_sp_VK24D	
	16	0.4	7.3	11.0	0.0	7.7	1.7	2.1	2.1	2.1	0.0	2.1	11.0	7.8	11.5	98.4	98.4	98.4	98.0	98.4	92.7	98.0	96.7	100.0	100.0	98.0	96.7	98.8	16	Mesorhizobium_sangaii	
	17	0.4	5.9	9.6	1.7	6.4	0.0	0.4	0.4	0.4	0.4	1.7	0.4	9.6	6.4	10.0	1.7	100.0	100.0	99.6	100.0	93.9	99.6	98.4	98.4	98.4	99.6	98.4	97.2	17	Mesorhizobium_qingshengii
	18	0.4	5.9	9.6	1.7	6.4	0.0	0.4	0.4	0.4	0.4	1.7	0.4	9.6	6.4	10.0	1.7	0.0	100.0	99.6	100.0	93.9	99.6	98.4	98.4	98.4	99.6	98.4	97.2	18	Mesorhizobium_melliloti
	19	0.4	5.9	9.6	1.7	6.4	0.0	0.4	0.4	0.4	0.4	1.7	0.4	9.6	6.4	10.0	1.7	0.0	99.6	100.0	93.9	99.6	98.4	98.4	98.4	98.4	99.6	98.4	97.2	19	Rhizobium_sphaerophysae
	20	0.8	6.4	10.0	2.1	6.8	0.4	0.8	0.8	0.8	2.1	0.8																			